

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Homöostase im Gehirn:  
Die differentielle Aktivität der Mikroglia**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**MAX DANIEL LINEU BRÜCK**  
aus **Darmstadt**

Kiel **2019**

1. Berichterstatter:

Prof. Ralph Lucius

2. Berichterstatter:

Prof. Karina Reiß

Tag der mündlichen Prüfung:

19.08.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel den

19.08.2020

---

gez. (Vorsitzender der Prüfungskommission)

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Was sind Mikroglia?	1
1.1.1 Erstbeschreibung	1
1.1.1.1 Ontogenese	2
1.2 Welche Funktion haben Mikroglia?	5
1.2.1 Konventionelle Einteilung der Mikroglia	6
1.2.2 Molekulare Einteilung der Mikroglia	7
1.3 Die verschiedenen Aktivitätsformen von Mikroglia	8
1.3.1 Klassische Aktivierung	8
1.3.2 Alternative Aktivierung	9
1.3.2.1 Subtypen der alternativen Aktivierung	11
1.3.2.2 Aktivitäts- bzw. Subtypen-switch	14
1.4 Fragestellung der Dissertation	15
<b>2 Material</b>	<b>16</b>
2.1 Organismen	16
2.2 Chemikalien	16
2.3 Puffer und Lösungen	18
2.4 Medien	18
2.5 Oligonukleotide (Primer)	19
2.6 Kits	19
2.7 Geräte	20
2.8 Verbrauchsmaterialien	22
2.9 Software	23
2.10 Datenbanken und Internetseiten	23
<b>3 Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Gewinnung primärer Mikrogliazellen	24
3.1.1 Isolation und Anzucht von Mikrogliazellen aus <i>Rattus norvegicus</i>	24
3.1.2 Ernte gezüchteter Mikrogliazellen	24
3.1.3 Aussaat von Mikrogliazellen zur Stimulation	25
3.2 Stimulation von primären Mikrogliazellen	25

3.3	RNA-Isolation	26
3.3.1	RNA-Isolation mit dem NucleoSpin® Mini Kit	27
3.3.2	RNA-Isolation durch Phenol-Chloroform-Extraktion	28
3.4	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	29
3.5	cDNA-Synthese	29
3.5.1	Synthese mit dem RT <sup>2</sup> First Strand cDNA Synthese Kit	30
3.5.2	Synthese mit dem Random Hexamer-Kit	33
3.6	Standard-PCR	35
3.6.1	Primer Funktionalitätsprüfung	35
3.7	Quantitative Real-Time PCR	37
3.7.1	RT <sup>2</sup> Custom qPCR Array™	37
3.7.1.1	Plattendesign	40
3.7.1.2	RT <sup>2</sup> SYBR Green qPCR Protokoll	41
3.7.1.3	Platten- und Datenauswertung	44
3.7.2	SOLIS BioDyne® Einzelplatten qPCR	45
3.7.2.1	Plattendesign	45
3.7.2.2	Plattenauswertung	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1	Selektion potenzieller Markermoleküle	50
4.2	RT <sup>2</sup> Custom qPCR Expressionsassay	50
4.2.1	Stimulation mit LPS	51
4.2.1.1	Expression putativ anti-inflammatorischer Markermoleküle	52
4.2.1.2	Expression putativ pro-inflammatorischer Markermoleküle	52
4.2.2	Stimulation mit IL-4	54
4.2.2.1	Expression putativ anti-inflammatorischer Markermoleküle	54
4.2.2.2	Expression putativer pro-inflammatorischer Markermoleküle	55
4.3	qPCR Einzelversuche	56
4.3.1	Stimulation mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13	57
4.3.1.1	Chi3L1	57
4.3.1.2	MRC1	59
4.3.1.3	FcγR2b	60
4.3.1.4	IGF-1	61

---

4.3.2	Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS bzw. IL-4 und TFF3	62
4.3.2.1	Chi3L1	62
4.3.2.2	MRC1	63
4.3.2.3	FcγR2b	64
4.3.2.4	IGF-1	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
5.1	Grundlagen	67
5.2	Markermolekül Präselektion	68
5.3	„ <i>unbiased</i> “ Assay	69
5.4	Einzelversuche	71
5.5	<i>shift</i> der Aktivität	76
5.6	Schlussfolgerung	77
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$ (Lambda)	Wellenlänge
$\gamma$ C	$\gamma$ -Chain (Gamma-Kette)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
18S rRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung
Act- $\beta$	$\beta$ - Actin
Amp	Ampicillin
Arg1	Arginase 1
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL2	CC - Chemokinligand 2
CCL22	CC - Chemokinligand 22
CCR2	CC-Chemokinrezeptor Typ 2
CD163	Cluster of Differentiation 163
CD200	Cluster of Differentiation 200
CD200R	Cluster of Differentiation 200 Rezeptor
CD209	Cluster of Differentiation 209
CD36	Cluster of Differentiation 36
CD80	Cluster of Differentiation 80
CD86	Cluster of Differentiation 86
cDNA	komplementäre DNA
Chi3L1	Chitinase-3- <i>like</i> protein 1
Chi3L3 (YM1)	Chitinase-3- <i>like</i> protein 3
$\text{cm}^2$	Quadratzentimeter
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
Ct (-Wert)	threshold cycle

---

CX3CR1 (GPR13)	Fraktalkinrezeptor (G-Protein <i>coupled</i> Rezeptor 13)
CXCL1	C-X-C Motif Chemokin 1
CXCL10	C-X-C Motif Chemokin 10
CXCL9	C-X-C Motif Chemokin 9
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonuklease
dt.	deutsch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol
FcγR1a (CD64)	Fc-Gamma-Rezeptor 1 a
FcγR2a (CD16)	Fc-Gamma-Rezeptor 2 a
FcγR2b (CD32)	Fc-Gamma-Rezeptor 2 b
Fcγ-Rezeptor	Fc-Gamma-Rezeptor
FcεR2 (CD23)	Fc-Epsilon-Rezeptor 2
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm oder Schwerebeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IFN-γ	Interferon Gamma
IGF-1	Insulin <i>like</i> growth factor 1
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-12α	Interleukin 12 alpha
IL-1Rα	Interleukin 1 Rezeptor alpha
IL-1α	Interleukin 1 alpha
IL-1β	Interleukin 1 Beta

---

IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-4R $\alpha$	Interleukin 4 Rezeptor alpha
IL-6	Interleukin 6
ROS (NOS2)	induzierbare NO-Synthetase
KO	Kontrolle
l	Liter
Lgals3	lectin galactoside-binding soluble 3; galectin 3
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MACROD2	mono-ADP ribosylhydrolase 2
mg	Milligramm
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex 2
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
MMP12	Matrix metalloproteinase-12
MRC1 (CD206)	C-Typ Mannose Rezeptor 1
mRNA	Messenger-RNA
MSR1 (CD204)	macrophage scavenger receptor 1
MW	Mittelwert
Myb	Transkriptionsfaktor Myb
n	Anzahl
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor</i> kappa B Komplex
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
NLRs	NOD- <i>like</i> Rezeptoren
NODs	Nucleotide-binding-oligomerization domains
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion



---

pH	<i>pondus Hydrogenii</i> ("Gewicht des Wasserstoffs")
PPC	positive PCR
Ptgs2 (Cox-2)	prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Cyclooxygenase 2
PU.1 (SPI-1)	Hematopoietic Transcription Factor PU.1 (Spi-1 Proto-Oncogene)
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RefSeq	Reference Sequence (-Database; NCBI)
Retnla (FIZZ1)	resistin <i>like</i> alpha, found in inflammatory zone 1
RGDC	Rat Genomic DNA Control
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum-Temperatur oder Reverse Transkription
RTC	Reverse Transcriptase Control
S	Sekunde(n)
s.	Seite
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
sp.	Spezies (Art)
SPhK-1	sphingosine kinase 1
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TFF3	trefoil factor 3
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TLRs	Toll- <i>like</i> Rezeptoren
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
tR	technische Replikate
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

tRNA	transfer RNA
U	Units oder Uracil
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Well	Vertiefung, Kuhle, Kulturschälchen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Was sind Mikroglia?

Mikroglia sind eine Population von residenten Glia-Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie machen zwischen fünf und 20 % der Gliazellmasse des ZNS aus (Perry, 1998). Auf ähnliche Weise wie die Makrophagen in der Peripherie, sind Mikrogliazellen dazu in der Lage sich durch das Parenchym des Gehirns zu bewegen. Durch die Annahme verschiedener Aktivitätsformen können sie dabei im ZNS die unterschiedlichen Rollen des Immunsystems übernehmen. So haben Mikroglia z.B. Einfluss auf die embryonale Entwicklung des ZNS, helfen bei der Abwehr von pathogenen Keimen, beeinflussen die Modulation von physiologischen und pathologischen Prozessen und treiben die Regeneration von Defekten an. Durch diese Fähigkeiten tragen Mikroglia zur Homöostase im ZNS bei.

### 1.1.1 Erstbeschreibung

Nach der Entdeckung neuer Färbemethoden in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts, wie z.B. der Nissl-Färbung (Nissl 1913; Kádár *et al.* 2009), konnten erstmals Zellen im ZNS beschrieben werden, die aufgrund ihrer besonderen Morphologie und ihres gehäuften Vorkommens in pathologisch verändertem Gewebe keinem der bekannten Zelltypen zuzuordnen waren. Sie wurden deshalb lange Zeit als eine Art von Glia-Zellen oder Astrozyten bezeichnet (Boya *et al.* 1979). Diese Klassifizierungen waren nicht sehr präzise, hielten sich aber dennoch bis in die dreißiger Jahre des 20. Jahrhunderts, ohne nennenswert weiterentwickelt zu werden.

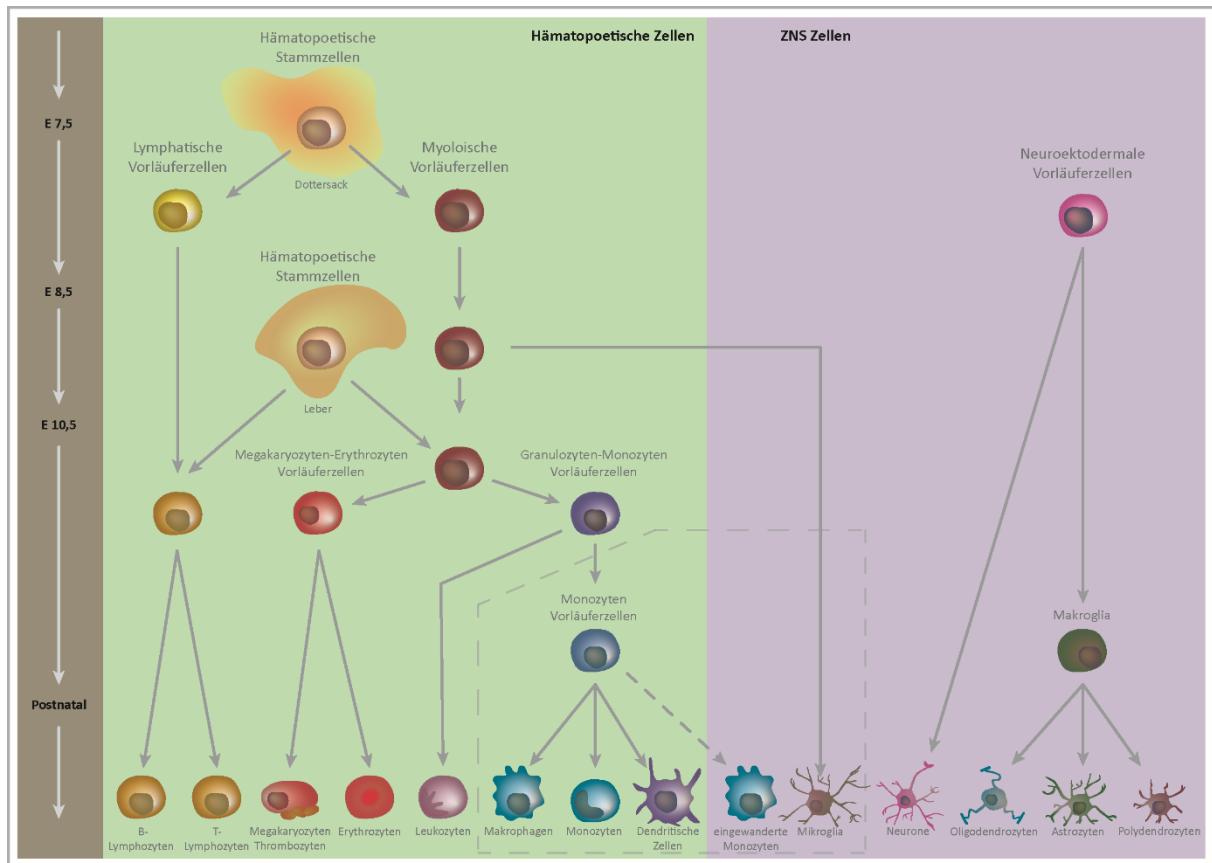
Im Kapitel „*Microglia*“ seines Buches *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (S. 481-534) aus dem Jahr 1932 (del Rio-Hortega 1932) charakterisierte Pio del Rio-Hortega diesen zuvor nur vage und auch sehr unterschiedlich beschriebenen Zelltyp zum ersten Mal detailliert. Dabei entwickelte er neue Theorien und setzte Standards, die noch heute Gültigkeit haben. So beschrieb del Rio-Hortega zum Beispiel, dass Mikroglia als Zellen mesodermalen Ursprungs früh in der Ontogenese in das ZNS migrieren und in Abhängigkeit vom Reizzustand ihrer Umgebung, verschiedene morphologische Formen annehmen können und dabei unterschiedliche Funktionen erfüllen.

### 1.1.1.1 Ontogenese

Doch obwohl del Rio-Hortega mit seiner detaillierten Beschreibung viele Fragen zur Biologie der Mikroglia beantwortete, gelang es ihm nicht die wahre Herkunft der Mikroglia zu identifizieren. Aufgrund von Ähnlichkeiten in ihrer Morphologie sowie ihrer phagozytotischen Eigenschaften postulierte er zwar eine Verbindung zwischen peripheren Makrophagen und Mikroglia, konnte diese aber nicht beweisen. So waren Arbeiten, die den Mikroglia eine neuroektodermale Herkunft oder aber eine Verwandtschaft mit Gefäß-Perizyten sowie mit subependymalen Geweben nahe legten bis in die 1980-er Jahre keine Seltenheit (Mori und Leblond, 1969; Barón und Gallego, 1972; Fedoroff und Hertz, 1981; Kitamura *et al.*, 1984).

Erst die immun-histochemische Untersuchung von spezifischen Makrophagen-Markern in Mäuse- und humanen-Mikroglia sowie die Untersuchung von *PU.1 knock-out* Mäusen bewies die Zugehörigkeit der Mikroglia zur myeloischen Reihe; und damit ihren mesodermalen Ursprung (Perry *et al.*, 1985; Akiyama und McGeer, 1990; McKercher *et al.*, 1996; D. R. Beers *et al.*, 2006; Ginhoux *et al.*, 2013). Mit diesen Methoden ließen sich in das ZNS eingewanderte makrophagenähnliche Zellen schon in einem frühen Stadium der embryonalen Entwicklung nachweisen. Die dabei beobachteten Zellen zeichneten sich durch ihre morphologischen und physiologischen Analogien, durch ihr spezifisches Verteilungs- und Migrationsmuster und durch ihre hohe Proliferationsbereitschaft aus. Diese Eigenschaften führten zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei diesen Zellen um Mikrogliazellen-Vorläufer handeln müsse (Perry *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1996; Alliot *et al.*, 1999).

Diesem Gedanken folgend kam die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt die Mikroglia-Vorläuferzellen in das ZNS gelangen. Als problematisch erwies sich bei der Beantwortung dieser Frage, dass die frühe Hämatopoese in zwei unterschiedlichen Kompartimenten abläuft: dem Dottersack und der fetalen Leber. Erst später übernimmt das Knochenmark die Aufgabe der Blutbildung (Tavian *et al.* 2005; Orkin *et al.* 2008; Ginhoux *et al.* 2013).



**Abbildung 1.1: Ontogenese der Mikroglia:** Die Population der residenten Mikrogliazellen des ZNS geht aus myeloischen Vorläuferzellen des Dottersacks hervor. Sie wandern in der frühen Embryogenese, zwischen dem 8. und dem 10. Gestationstag, in das ZNS aus. Abgebildet ist hier die Hämatopoese (grün) sowie die Neurogenese (violett) bei Mäusen. Die Zeitachse ist in Form der Mausentwicklung angegeben (grau, links). (verändert nach Ransohoff und Cardona 2010; Kierdorf und Prinz 2013; Ginhoux *et al.* 2013; De Kleer *et al.* 2014)

In der Embryogenese der Maus kommt es bereits am 7. Gestationstag (E7) zur Ausbildung von Blutinseln im extraembryonal angelegten Dottersack (siehe Abb. 1.1). Hier beginnt die fetale Hämatopoese, wobei zunächst überwiegend lymphatische und myeloische Vorläuferzellen gebildet werden. Aus den zuletzt genannten Zellen gehen überwiegend frühe Erythrozyten (Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzellen) sowie Vorläufer der Makrophagen und Mikrogliazellen hervor (Bertrand *et al.* 2005). Die dabei gebildeten frühen Makrophagen-Vorläuferzellen unterscheiden sich von den reifen Mikrogliazellen des ZNS u.a. durch ihre Unabhängigkeit vom Transkriptionsfaktor *Myb* (Schulz *et al.* 2012). Mit der Entwicklung des fetalen Blutkreislaufsystems zwischen dem 8,5. und 10. Gestationstag (E8,5 – E10) wandern die Monozyten-Vorläuferzellen in die peripheren Gewebe des Embryos ein. Zur selben Zeit besiedeln Mikroglia-Vorläuferzellen aus dem Zellpool des embryonalen Dottersacks das noch junge Gehirn

(McGrath *et al.* 2003; Mizutani *et al.* 2012; Ginhoux *et al.* 2013). Im peripheren Gewebe und im ZNS angekommen zeigen sowohl die primären Makrophagen als auch die Mikroglia-Vorläuferzellen ein stark proliferatives Verhalten (Perry *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1996; Alliot *et al.*, 1999). Ab dem 8,5. Gestationstag (E8,5) kommt es zur Ausbildung zusätzlicher hämatopoetisch aktiver Gewebe im Bereich der Aorta, der Gonaden und der Mesonephrone des Embryos (Godin *et al.* 1993; Medvinsky *et al.* 1993). Die hier gebildeten hämatopoetischen Stammzellen wandern ab dem 10,5. Gestationstag in die fetale Leber ein. Dort bilden Sie ab dem 11,5. Gestationstag das endgültige, definitive hämatopoetische Gewebe des Fetus (Naito *et al.*, 1990; Kumaravelu *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2012).

Diese aus Versuchen mit Mäusen gewonnenen Erkenntnisse konnten in Experimenten mit humanen-, Ratten-, Zebrafisch- und Vogel-Zellen nachvollzogen und bestätigt werden. Unterschiede bei den Zellen verschiedener Herkunft bestanden im zeitlichen Ablauf der Embryogenese sowie in der Art der Auswanderung von Mikroglia-Vorläuferzellen. Aus den diesbezüglichen Forschungsergebnissen wurde auf einen hohen Konservierungsgrad bei der Entstehung von Mikroglia-Vorläuferzellen aus dem Dottersack geschlossen (Cuadros *et al.* 1998; Herbomel *et al.* 2001; Tavian *et al.* 2005).

Wenn die in der frühen Embryogenese eingewanderten Mikrogliazellen im fetalen Gehirn angekommen sind, lagern sie sich zunächst in Form von Zellnestern zusammen. Aus diesen Zellnestern besiedeln die Zellen dann im Laufe der postnatalen Entwicklung alle anderen Teile des ZNS (Kettenmann *et al.* 2011). Dabei kommt es im ZNS durch den Anstieg der Proliferationsrate der residenten Mikroglia-Vorläuferzellen zu einer starken Zunahme der Mikroglia-Zellpopulation (Matsumoto und Fujiwara, 1987; Lassmann und Hickey, 1993; Alliot *et al.* 1999; Priller *et al.*, 2001; David R Beers *et al.*, 2006; Tambuyzer *et al.*, 2009). Im adulten Gehirn bilden die Mikrogliazellen dann einen stabilen Pool an residenten Zellen und machen ca. 10% der gesamten Zellmasse des ZNS aus. Sie repräsentieren damit den wichtigsten Anteil des angeborenen Immunsystems im ZNS (Kettenmann *et al.* 2011). Die eingewanderten peripheren Makrophagen tragen nur geringfügig zur Erneuerung der Population von Entzündungszellen im ZNS bei (Ginhoux *et al.* 2010). Der zahlenmäßig größte Teil dieser Zellen ist von der Selbsterneuerungskapazität des bestehenden primären Zellpools abhängig.

Im Rahmen von neuroinflammatorischen Prozessen kommt es zu sogenannten reaktiven Mikroglialosen (Streit *et al.*, 1999; Vallières und Sawchenko, 2003; Ladeby *et al.*, 2005; Mildner *et al.*, 2007). Diese zeichnen sich durch einen starken Anstieg von entzündungsmediierenden Zellen nach einem akuten Trauma oder einer Störung der Homöostase des ZNS aus. Die starke Zunahme der Zellzahl ist am ehesten auf eine Lückenbildung in der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zurückzuführen. Infolge dieser Lückenbildung können periphere Makrophagen vermehrt in das ZNS einwandern. Die von den Mikrogliazellen und Makrophagen konsekutiv ausgelösten Entzündungsprozesse können ihrerseits in erheblichem Maße zur Aufrechterhaltung und Ausweitung einer neurologischen Symptomatik beitragen (Ajami *et al.* 2007; Mildner *et al.* 2007; Ginhoux *et al.* 2010). Die Eindämmung von derartigen unkontrollierten Entzündungsprozessen im ZNS ist für den Organismus überlebenswichtig und stellt eine der bedeutendsten Aufgaben der Mikrogliazellen dar.

## 1.2 Welche Funktion haben Mikroglia?

Das zentrale Nervensystem ist als ein besonders immunprivilegierter Bereich von der Aufrechterhaltung eines empfindlichen Gleichgewichtes verschiedener Faktoren abhängig. Veränderungen und Schädigungen dieses Gleichgewichtes können die Integrität des Gehirnes leicht stören. Eine solche Störung kann weitreichende Folgen für den gesamten Organismus haben.

Durch die Regulation von apoptotischen Prozessen und von synaptischer Elimination sowie durch die Modulation der Neurogenese können Mikroglia auf die neuronale Plastizität Einfluss nehmen. Infolge solcher Einflussnahme können Mikrogliazellen auf Lernprozesse einwirken und u.a. die Entwicklung ganzer Hirnareale beeinflussen. Als lokale Vertreter des Immunsystems im ZNS übernehmen Mikroglia darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der Modulation von Entzündungsprozessen. Hierdurch tragen die Mikrogliazellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS bei (Graeber, 2010; Graeber *et al.*, 2011; Tremblay *et al.*, 2011; Daneman, 2012; Hughes, 2012; Katsumoto *et al.*, 2014; Prinz und Priller, 2014; Salter und Beggs, 2014; Loane und Kumar, 2015).

### 1.2.1 Konventionelle Einteilung der Mikroglia

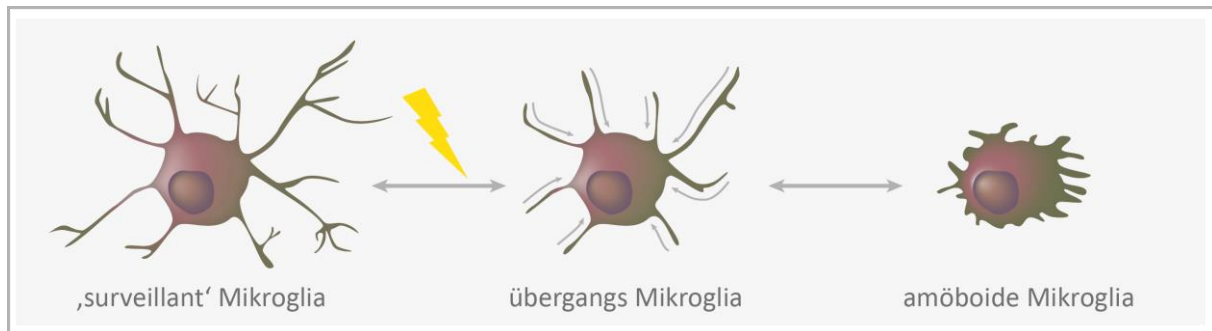
In konventioneller Weise werden Mikrogliazellen anhand ihrer funktionellen und morphologischen Eigenschaften verschiedenen Aktivitätsformen zugeteilt (Kettenmann *et al.*, 2011).

Betrachtet man Mikrogliazellen, die aus gesunden Gehirnen stammen und die in ihrem physiologischen Zustand vorliegen unter dem Mikroskop, weisen diese Zellen eine Art „ruhendes“ Stadium auf. Hierbei haben die Zellen einen kleinen Zellkörper (Soma) und verfügen über ein nach Art eines Astes verzweigtes System von Zellfortsätzen, die sie in die Peripherie ausstrecken. Aufgrund dieser morphologischen Eigenschaft bezeichnete man dieses Aktivitätsstadium oft als *ramified* oder *resting*, dt. verästelt oder ruhend. Lange Zeit wurden diese Begriffe sogar als Synonym für den vermeintlich ruhenden Zustand der Zellen verwendet (Streit *et al.* 1999; Kettenmann *et al.* 2011). Heutzutage jedoch nimmt man an, dass die Zellen in diesem Aktivitätsstadium nicht ruhen, sondern im Gegenteil sehr aktiv mit ihrer Umwelt interagieren. So konnten Nimmerjahn *et al.* zeigen, dass die Zellfortsätze nicht, wie zuvor angenommen, unbeweglich sind, sondern vielmehr ein System aus sich ständig verändernden Fortsätzen bilden (Nimmerjahn *et al.* 2005; Tremblay *et al.* 2011). Die Zellen ziehen dabei in einem fortwährenden Prozess bestehende Fortsätze ein um sie erneut in andere Bereiche des ZNS-Parenchyms auszustrecken. Es wird angenommen, dass die Mikroglia hierdurch in der Lage sind, das gesamte ZNS kontinuierlich mit ihren Zellfortsätzen abzutasten und so zu überwachen. Aus diesem Grund wird die gegenwärtig verbreitet angewendete Bezeichnung ‚*surveillant*‘ Mikroglia, dt. überwachende Mikroglia, der Aufgabe der Mikrogliazellen in diesem Stadium gerechter (Davalos *et al.* 2005; Nimmerjahn *et al.* 2005; Cherry *et al.* 2014).

Nehmen Mikrogliazellen bei der Überwachung des ZNS pathologische Veränderungen oder Störungen der Homöostase wahr, so ändert sich ihr Aktivitätsstadium von ‚*surveillant*‘ zu aktiviert. Dies geschieht über eine Reihe von reversiblen Zwischenschritten, die am Ende zu einer deutlichen morphologischen Veränderung der Zellen führen. Zunächst beginnen die Zellen nach ihrer Aktivierung ihre verästelten Zellfortsätze einzuziehen. Das Soma nimmt infolgedessen an Volumen zu. Zur gleichen Zeit nehmen die Mikrogliazellen eine amöboide, den peripheren Makrophagen ähnliche Form an. Dies ermöglicht ihnen, sich frei durch das Parenchym und auf die Quelle der Störung hin zu bewegen (Streit *et al.* 1999;



Stence *et al.* 2001; Lynch 2009) (siehe Abb.: 1.2). Am Ort der Störung angekommen tragen Mikrogliazellen durch die Phagozytose von Zellabfällen und von akkumulierten Zellmetaboliten zur Wiederherstellung eines physiologischen Zustandes bei. Auf diese Weise wirken die Mikrogliazellen als Modulatoren einer neuronalen Entzündung, der so genannten Neuroinflammation (Loane *et al.* 2015).



**Abbildung 1.2: Differenzierung von Mikrogliazellen:** Nehmen ‚surveillant‘ Mikrogliazellen eine Störung der Homöostase oder einen bestimmten immunologischen Reiz wahr (gelber Pfeil), dann können sie ihre Zellfortsätze einziehen und eine amöboide Form annehmen. Mit diesem Phänotyp ist es ihnen möglich sich auf eine Störung hin zu bewegen. Dieser Prozess ist reversibel.

### 1.2.2 Molekulare Einteilung der Mikroglia

Um die gesamte Komplexität der Regulation von Entzündungs- und Entwicklungsprozessen im ZNS abzubilden, ist das vereinfachte Model der konventionellen Einteilung der Mikrogliazellen nur unzureichend geeignet. In heutiger Zeit verwendet man aus diesem Grund vor allem die Ausstattung der Zellen mit Markermolekülen, um ihre Aktivitätszustände voneinander zu unterscheiden. Man bedient sich dabei u.a. des Nachweises spezieller Zell-Oberflächenmarker, bestimmter sezernierter Chemokine oder von den Zellen gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Chhor *et al.* 2013; Amici *et al.* 2017). Die der konventionellen Einteilung entsprechenden ‚surveillant‘ Mikroglia können in der molekularen Einteilung durch ein Set von bestimmten Molekülen wie z.B. Toll-*like* Rezeptoren (TLRs), NOD-*like* Rezeptoren (nucleotide-binding oligomerization domain *like* receptors; NLRs) sowie „Scavenger“ Rezeptoren charakterisiert werden. Diese Moleküle versetzen die Mikrogliazellen in die Lage, das ZNS nach Pathogenen, Störungen und Zelldebris zu durchsuchen (Hanisch *et al.* 2007; Ransohoff *et al.* 2010; Ransohoff *et al.* 2012; Cherry *et al.* 2014).

### 1.3 Die verschiedenen Aktivitätsformen von Mikroglia

Durch die geschickte Auswahl und den gezielten Einsatz von speziellen Markermolekülen lassen sich neben den ‚surveillant‘ Mikroglia auch die aktivierten Mikrogliazellen unterschiedlichen Aktivitätsstadien zuordnen. In einem vereinfachten Modell werden in dieser Beziehung zwei entgegengesetzte Formen der Aktivität von Mikrogliazellen beschrieben. Auf der einen Seite die klassische Aktivierung, auf der anderen Seite die alternative Aktivierung.

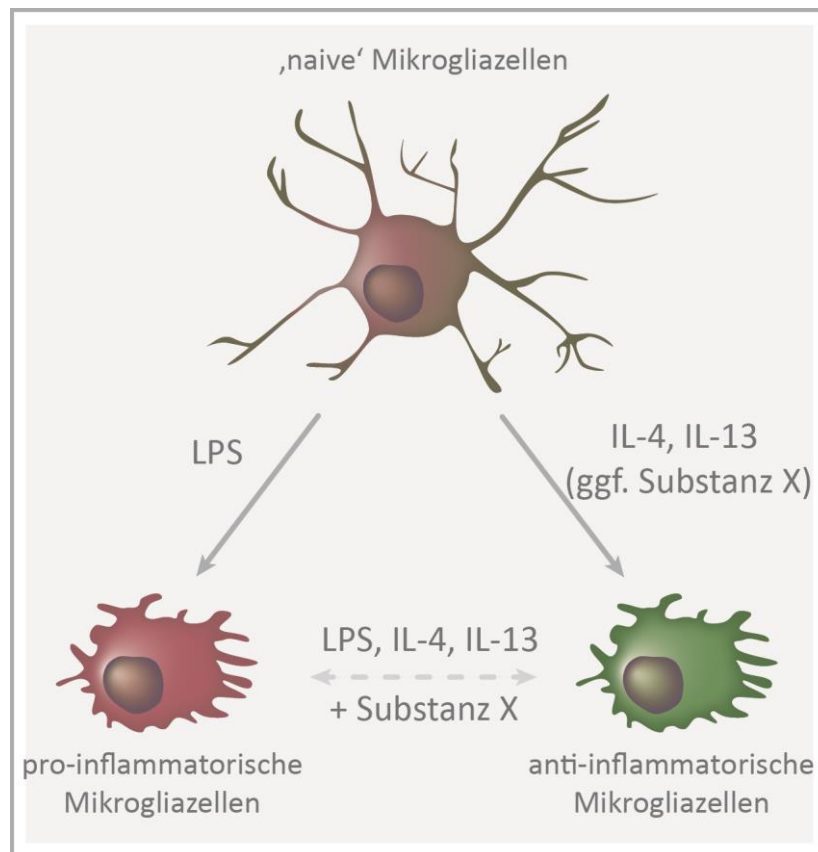
#### 1.3.1 Klassische Aktivierung

Werden Mikrogliazellen durch die Wahrnehmung einer Störung oder durch die Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert, so beginnen sie mit der Produktion von entzündungs-assoziierten Molekülen. Dazu gehören u.a. Zytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-12 oder Chemokine wie z.B. CCL2, CxCL9, CXCL10, IL-6, IFN $\gamma$ , Fc $\gamma$ -Rezeptoren und CD86 bzw. MHC II oder auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Abd-El-Basset *et al.* 1995; Gordon 2003; Taylor *et al.* 2005; Hanisch *et al.* 2007; Sica *et al.* 2012; Boche *et al.* 2013).

Mit Hilfe dieser Mediatormoleküle können Mikrogliazellen u.a. intrazelluläre Pathogene identifizieren sowie durch Antigenpräsentation eine weitere Aktivierung des Immunsystems initiieren und infolgedessen zu einer Beseitigung der Schädigung beitragen (Cherry *et al.* 2014; Loane *et al.* 2015). Mikrogliazellen, die Entzündungsprozesse im ZNS auf diese Weise anfachen und dadurch eine Neuroinflammation medieren, werden als pro-inflammatorische oder klassisch aktivierte Mikrogliazellen bezeichnet.

Die von den Mikrogliazellen freigesetzten Zytokine, Chemokine und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind jedoch auch selbst in der Lage den Neuronen und der Glia-Zellmasse des ZNS zu schaden. Wird eine einmal angestoßene Entzündungsreaktion unkontrolliert lange anhalten, so kann dies zu einer weitgehenden Zerstörung des ZNS führen. Die Integrität und die Homöostase des Gehirns wären dadurch empfindlich beeinträchtigt. Diesem Gedanken folgend postulierten Colton *et al.* und Kigerl *et al.* (2009), dass eine einmal begonnene Aktivierung der Mikrogliazellen hin zu einer destruktiven, pro-inflammatorischen Aktivitätsform zu einer sich stetig ausbreitenden Entzündung führen müsse, wenn dieser

Prozess nicht unterbrochen wird (Colton 2009; Kigerl *et al.* 2009). Da solche sich exponentiell ausbreitenden Entzündungsprozesse im ZNS aber nicht der Regel entsprechen nahmen Sie an, dass Mikrogliazellen neben einer pro-inflammatorischen Aktivitätsform auch eine anti-inflammatorische Aktivitätsform haben müssen, die den destruktiven Eigenschaften entgegenwirken und ihnen so Einhalt gebieten können.

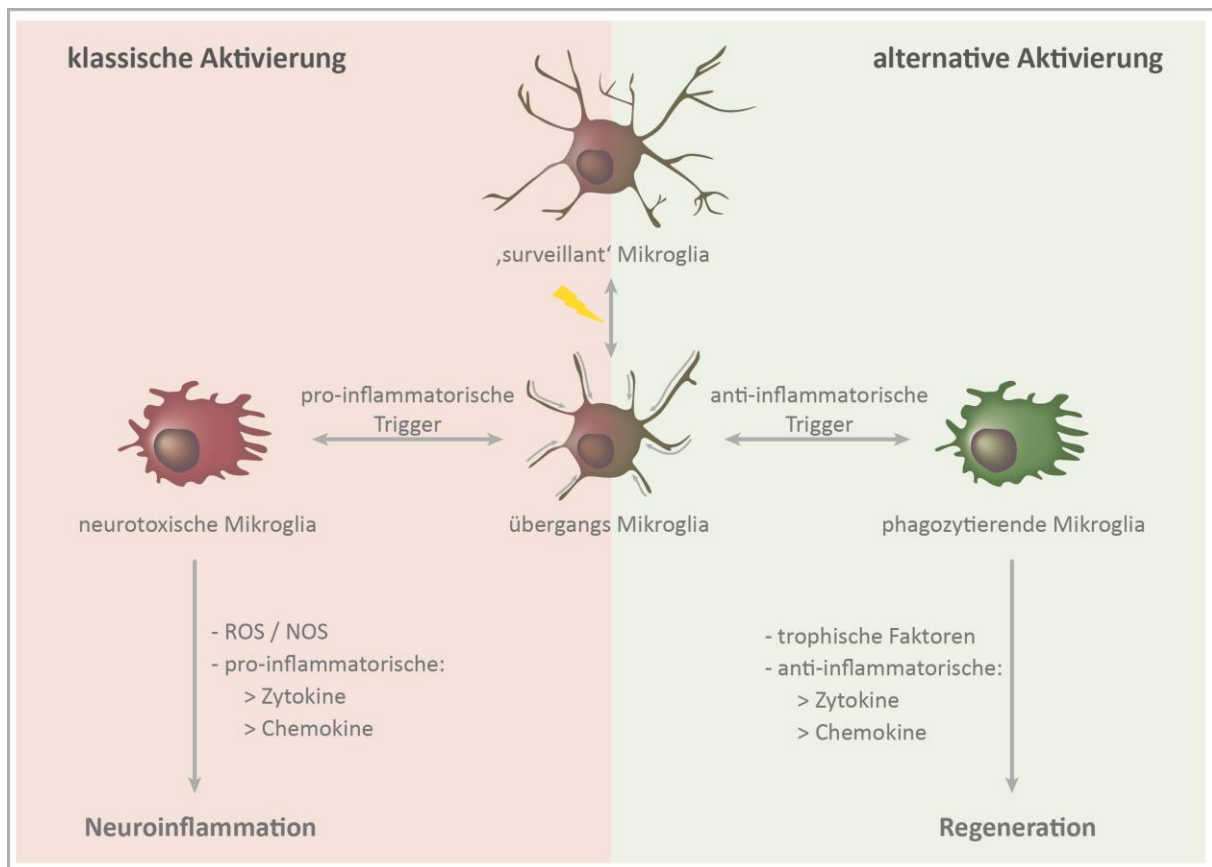


**Abbildung 1.3: Verschiebung der Differenzierung:** Durch die Ko-Stimulation kann die Möglichkeit bestehen, die Differenzierung einer Mikrogliazelle von einer pro- hin zu einer anti-inflammatorischen Zelle zu verschieben. Die Kombination von Stimulationssubstanzen LPS (Lipopolysaccharid) bzw. IL-4 (Interleukin - 4) mit bestimmten Substanzen (Substanz X) kann zu einer verstärkten Reaktion oder einem *shift* der Aktivitätszustände führen.

### 1.3.2 Alternative Aktivierung

Ein derartiges Verhalten ist bei peripheren Makrophagen gut erforscht und beschrieben. Die peripheren Makrophagen sind in der Lage, auf unterschiedliche Stimuli aus ihrer Umgebung mit einem hohen Grad der Plastizität zu reagieren. Sie können je nach Art des Stimulus ihren Phänotyp und ihre Funktion der entsprechenden Umgebungssituation anpassen. Dadurch sind die Makrophagen befähigt, den Verlauf eines

Entzündungsgeschehens zu beeinflussen und die weitere Entwicklung einer Entzündung in eine bestimmte Richtung zu lenken. Diesen Prozess der Veränderung des angeborenen Immunsystems nennt man Makrophagen-Polarisation. Dabei können die Makrophagen ein proinflammatorisches Stadium, das oft als M1 bezeichnet wird und ein antiinflammatorisches Stadium, das oft als M2 bezeichnet wird, annehmen (Varin *et al.* 2009; Sica *et al.* 2012).



**Abbildung 1.4: Differenzielle Aktivierung von Mikroglia:** In Abhängigkeit von den Signalen, die auf die Mikroglia wirken, differenzieren sich die Zellen entweder hin zu einer pro-inflammatorischen Form (klassische Aktivierung, M1) oder hin zu einer anti-inflammatorischen Form (alternative Aktivierung, M2). Auf diese Weise können Mikroglia wahrscheinlich zur Plastizität der Entzündungsentwicklung im Gehirn beitragen. (verändert nach Ransohoff und Cardona 2010; Kierdorf und Prinz 2013)

In Anlehnung an das Konzept der Makrophagen-Polarisation und dem ursprünglichen Glauben folgend, dass es sich bei den beiden Zellpopulationen im ZNS um Derivate derselben Zelllinie handelte, übertrug man die Theorie der differentiellen Aktivierung auf die Mikroglia (Colton 2009). Die anti-inflammatorische Aktivierung der Mikroglia bezeichnete man folglich als alternative Aktivierung, vereinfacht M2 Mikroglia genannt. Die klassisch aktivierten Mikrogliazellen wurde demgegenüber verkürzt als M1 Mikroglia bezeichnet.

In neuerer Zeit mehren sich jedoch die Hinweise, dass dieses stark vereinfachte Modell der Makrophagen-Polarisation nicht uneingeschränkt auf die differenzielle Mikroglia-Aktivierung übertragen werden kann. So basieren viele der heute anerkannten Theorien ausschließlich auf den Forschungen der letzten 30 Jahre an peripheren Makrophagen. Häufig kamen bei diesen Forschungen stark vereinfachte *in vitro* Experimente zum Einsatz, die sich nur sehr schwer auf die Dynamik anderer Zellpopulationen übertragen lassen, wie sie z.B. im neuronalen Modell der Mikroglia-Aktivierung vorkommen. In jüngerer Zeit werden aus diesem Grund vermehrt Experimente an Mikrogliazellen durchgeführt, um Licht in das Dunkel der differenziellen Mikroglia-Aktivierung zu bringen. Um diesem Wandel in den Ergebnissen der neueren Forschung Rechnung zu tragen, werden die klassisch und die alternativ aktivierten Mikroglia heute - einer neuen Terminologie folgend - in die Aktivitätsstadien M1-like bzw. M1(LPS) und M2-like bzw. M2(IL-4) eingeteilt. Zusätzlich wird dem Aktivitätsstatus der entsprechende Aktivitäts-Subtyp durch die Kleinbuchstaben a, b bzw. c benannt und die Stimulationssubstanz in Klammern angefügt (Mosser *et al.* 2008; Cherry *et al.* 2014; Butovsky *et al.* 2014; Amici *et al.* 2017).

#### 1.3.2.1 Subtypen der alternativen Aktivierung

Allen alternativ aktivierten M2-like Mikroglia ist gemeinsam, dass sie Mediatoren oder Rezeptoren exprimieren, die in der Lage sind Entzündungsprozesse zu unterdrücken bzw. zu reparieren und so den Körper vor den destruktiven Eigenschaften des Immunsystems zu schützen (Varin *et al.* 2009). In Abhängigkeit von der jeweils durchgeführten Aufgabe nehmen Mikrogliazellen eine Vielzahl verschiedener Unterformen der alternativen Aktivierung an. Um diese Subtypen zu charakterisieren und voneinander zu unterscheiden, bedient man sich verschiedener molekularbiologischer Techniken. Zum einen werden die Aktivitätszustände der Mikrogliazellen anhand der Substanzen unterschieden, durch die sie hervorgerufen werden, zum andern unterscheidet man die Mikroglia Subtypen mit der Benennung derjenigen Markermoleküle, die die Zellen in den verschiedenen Aktivitätszuständen exprimieren.

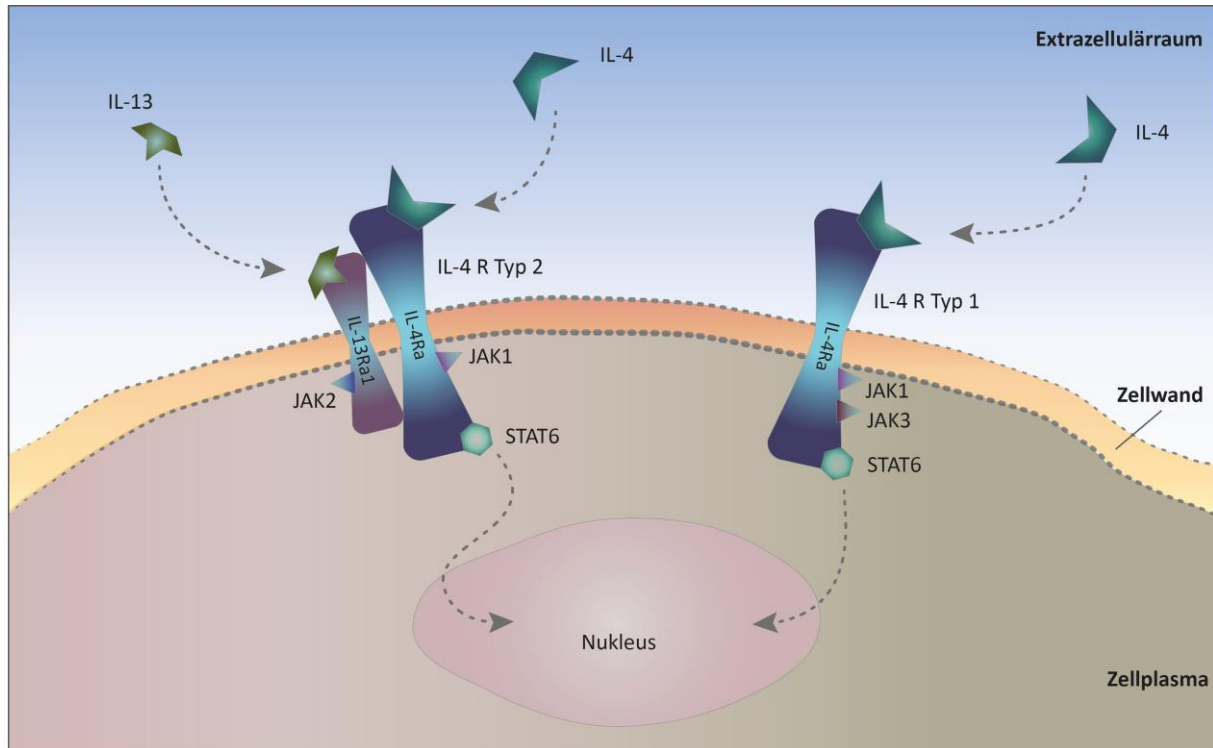
Bei der Identifikation der Subtypen durch die Verwendung von bestimmten Stimulationssubstanzen kommt - in Anlehnung an die ersten Versuche zur Makrophagen-Polarisation durch Stein *et al.* (1992) - das Zytokin Interleukin-4 (IL-4) zum Einsatz. Stein und

seine Kollegen beobachteten, dass periphere Makrophagen nach der Stimulation mit IL-4 einen Mannose-Rezeptor exprimierten. Dies entsprach einem neuen, zuvor nicht beschriebenen Typ von aktivierten Makrophagen. Makrophagen, die eine solche Rezeptorausstattung aufwiesen, wurden folglich als ‚alternativ aktivierte‘ Makrophagen bezeichnet (Stein *et al.* 1992).

Bei Mikrogliazellen initiiert IL-4 die Zellaktivierung durch Bindung an seinen Rezeptor IL-4R $\alpha$ . Dieser bildet nach der Bindung von IL-4 ein Heterodimer mit entweder der Gamma-Kette  $\gamma$ C oder mit der IL-13R $\alpha$ 1 Untereinheit, der Bindungsstelle für Interleukin 13 (IL-13). Nach der Heterodimerisierung entsteht entweder der Typ 1 Rezeptor (IL-4R $\alpha$ / $\gamma$ C) oder der Typ 2 Rezeptor (IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1). In beiden Fällen kommt es durch eine Phosphorylierung von Tyrosinkinasen am intrazellulären Teil des IL-4R $\alpha$  zu einer Aktivierung des Jak-STAT Signalweges. Über diesen können die Liganden IL-4 bzw. IL-13 die Expression von IL-4/IL-13 abhängigen Genen initiieren und modulieren (Ferreira *et al.* 2014) (siehe Abb. 1.5).

Als Folge dieser Aktivierung beginnen Mikrogliazellen mit der Expression von mit anti-inflammatorischen Prozessen assoziierten Molekülen, wie z.B Arg1, CD206, YM1 oder Fizz1. Gleichzeitig kann die Expression von an der Phagozytose beteiligten Rezeptoren erhöht oder die Expression von *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) Isoformen reduziert werden, was zu einer Abnahme des Entzündungsmaßes führt (Gordon 2003; Taylor *et al.* 2005; Colton 2009; Gadani *et al.* 2012; Sica *et al.* 2012). Diese Art der Aktivierung wird als M2a(IL-4) bezeichnet und mit der Unterdrückung von Entzündungsprozessen, der Reparatur von geschädigtem Gewebe und der Stimulation von Zellwachstum in Verbindung gebracht. Werden Makrophagen mit Interleukin-10 (IL-10), Glucocorticoiden oder durch die Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial stimuliert, nehmen sie einen als M2c(X) bezeichneten Phänotyp an, wobei das X die jeweilige Stimulationssubstanz kennzeichnet. Dieser Phänotyp zeichnet sich dadurch aus, dass er in Prozessen der Gewebsneuorganisation und bei der Narbenbildung nach Entzündungsprozessen involviert ist. Durch den Nachweis von CD163, CD206, TGF- $\beta$  und SPhK-1 lässt sich das Vorhandensein dieses Subtyps nachweisen (Mantovani *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2008; Loane *et al.* 2015). Einem dritten Subtyp, als M2b bezeichnet, wird eine Mediatorrolle der alternativen Zellaktivierung zugewiesen (Cherry *et al.* 2014). Stimuliert durch Toll-like Rezeptoren oder Immunkomplexe lassen sich Zellen dieses Subtyps weder eindeutig

der alternativen noch der klassischen Aktivierung zuordnen. Die Zellen dieses Subtyps weisen vielmehr Merkmale beider Aktivitätsformen auf und exprimieren sowohl M1-*like* als auch M2-*like* Oberflächenmarker.



**Abbildung 1.5: Schema der IL-4 und IL-13 Rezeptoren;** IL-4 kann an zwei Rezeptortypen binden (IL-4 R Typ 1 / IL-4 R Typ 2) und die Expression entsprechender IL-4 abhängiger Gene über eine JAK/STAT Signaltransduktionskaskade beeinflussen. An den Typ 2 Rezeptor kann ein IL-13/IL-13Ra1 Komplex binden. Auf diese Weise beeinflusst auch IL-13 die Expression von IL-4 abhängigen Genen. Ob es eine Verstärkung des Expressionsstimulus durch diese doppelte Stimulation gibt, ist bislang ungeklärt (verändert nach Ferreira *et al.* 2014)

Die Ermittlung eines allgemeingültigen Markermoleküls oder eines Sets von Markermolekülen zur eindeutigen Identifizierung von differenziell aktivierten Mikroglia ist bis heute Gegenstand der Forschung und der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Bei der Analyse von an Mäusen, an Ratten oder an menschlichen Mikrogliazellen durchgeführten Experimenten wird jedoch klar, dass ein Großteil der zur Identifizierung verwendeten Markermoleküle nicht bei allen Modellorganismen konserviert ist (Raes *et al.* 2005; Cherry *et al.* 2014; Lively *et al.* 2018). Es stellt sich demnach als sehr kompliziert heraus, Markermoleküle, die in einem bestimmten Aktivitätszustand wirksam sind bzw. die in dem einem Modell Gültigkeit besitzen, auf ein anderes Modell zu übertragen. Abgesehen davon lassen sich eine Vielzahl der aus *in vivo* Experimenten gewonnenen Erkenntnisse über

Markermoleküle nicht ohne weiteres auf diejenigen aus *in vitro* Experimenten gewonnenen Ergebnisse übertragen (Novak *et al.* 2013).

Die Oberflächenmarkerprofile und der Phänotyp einer Zelle innerhalb einer Zellpopulation sind zudem stark vom bestehenden Aktivitätszustand der Zellen, von ihrem Alter und von ihrer Umgebung abhängig (Norden *et al.* 2014; Loane *et al.* 2015).

### 1.3.2.2 Aktivitäts- bzw. Subtypen-switch

Um dem eingangs erwähnten destruktiven Potential von klassisch aktivierten Mikrogliazellen entgegenzuwirken und damit eine weitere Schädigung des ZNS zu verhindern, erscheint es bei einem therapeutischen Ansatz notwendig die Zellen in eine alternative Aktivitätsform zu überführen; d.h. einen *switch* der Aktivitätsform bzw. des Subtyps vorzunehmen.

Ein Molekül, das über ein derartiges Potential verfügt, ist der trefoil factor 3 (TFF3). Es handelt sich dabei um eines von drei bei Säugetieren bekannten Molekülen aus der trefoil-Familie (TFF1, TFF2 und TFF3), die durch eine an ein Kleeblatt erinnernde Dreipass-Struktur gekennzeichnet sind (Itoh *et al.* 1996; Thim 1997; Muskett *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass TFF3 in den verschiedensten Organsystemen wie z.B. der gastrointestinalen Schleimhaut, den Atemwegen, dem Pankreas, den Speicheldrüsen, in chronisch entzündeten und heilenden Geweben sowie im ZNS der Säugetiere vorkommt (Probst *et al.*, 1996; dos Santos Silva *et al.*, 2000; Jagla *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001; Hinz *et al.*, 2004; Rösler *et al.*, 2010; Guppy *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014). In der Arbeit von Arnold und Rickert *et al.* wurde gezeigt, dass bei Ratten der TFF3 innerhalb des ZNS von primären Ratten Astrozyten gebildet und von diesen in den Interzellularraum sezerniert wird (Arnold und Rickert *et al.* 2016). Aus der Kombination der Beobachtung, dass Astrozyten die Entzündungsprozesse im Gehirn modulieren können und dass TFF3 im GIT anti-inflammatorische Effekte aufweist, lässt sich ableiten, dass TFF3 auch im ZNS einen modulierenden Einfluss auf die Aktivitätszustände der Mikroglia haben kann (Vincent *et al.* 1997; Hoffmann *et al.* 2001; Deng *et al.* 2010). Darüber hinaus bestätigen die *in cellulo* Untersuchungen von Arnold und Rickert *et al.*, dass die TFF3 pre-Inkubation von mit LPS stimulierten Mikrogliazellen zu einer signifikanten Abnahme von mit der klassischen Aktivität verknüpften Molekülen assoziiert ist. Außerdem lassen sich durch alleinige



Stimulation mit TFF3 keine signifikanten Effekte erzielen. Deshalb erscheint es nach Arnold und Rickert *et al.* möglich, dass TFF3 als Mediator für einen Aktivitäts- bzw. Subtypen-*switch* von der klassischen hin zur alternativen Aktivierung wirkt (Arnold und Rickert *et al.* 2016).

## 1.4 Fragestellung der Dissertation

Die Anpassung der Methodik und des Vorgehens zur Identifizierung von differenziell aktivierten Mikrogliazellen sowie die Verbesserung des allgemeinen Verständnisses der differenziellen Aktivierung von Mikrogliazellen sind die Zielsetzung dieser Dissertation. Dementsprechend sollte der am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität verwendete Studienaufbau zur Identifizierung von potenziell neuroprotektiven Substanzen um die Möglichkeit der Detektion einer Verschiebung der Entzündungsreaktion von pro- zu anti- inflammatorisch erweitert werden. Erreicht werden sollte die Etablierung eines Standardsets an Markermolekülen zur Identifizierung von IL-4 (M2a) stimulierten primären Ratten-Mikroglia.

Zu diesem Zweck wurden mittels Analyse verschiedener Datenbanken zunächst potenzielle Markergene ausgewählt. In einem ‚*unbiased*‘ qPCR Ansatz sollte daran anschließend auf die Aktivität der Expression dieser potenziellen Markergene geschlossen werden. Die Zellen wurden hierzu für unterschiedlich lange Zeiträume mit Lipopolysaccharid (LPS) bzw. Interleukin-4 (IL-4) stimuliert.

Um das Expressionsverhalten einzelner Gene genauer bestimmen zu können, wurde ein Set von vielversprechenden Genen aus dem ‚*unbiased*‘ qPCR Ansatz ausgewählt. Diese Gene wurden in einzelnen qPCR Experimenten weiter untersucht, um deren Expressionsverhalten zu analysieren.

Um darüber hinaus Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der Expression dieser Gene durch die Wirkung von potenziell anti-inflammatorischen Stimulantien zu treffen, wurden die Zellen mit *Trefoil Factor 3* co-stimuliert.

## 2 Material

### 2.1 Organismen

Die für die Durchführung dieser Arbeit bzw. die für die angewendeten Methoden benötigten primären Mikrogliazellen wurden aus 1-3 Tage alten Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes *Sprague Dawley* isoliert. Die Tiere wurden im Viktor-Hensen-Tierhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Einhaltung der ethischen Vorgaben unter Standardbedingungen zu Forschungszwecken gezüchtet und gehalten.

### 2.2 Chemikalien

#### Chemikalien:

#### Bezugsquellen:

Agarose	Roth
Ampicillin	Merck
Azeton	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
dNTPs (100 mM)	Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Serva
Dulbecco's PBS (Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> frei)	PAN Biotech
EDTA	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol (unvergällt)	Roth
Ethanol (vergällt)	Roth
Ethidiumbromid (50 mg/ml)	Roth
Formamid	Merck
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas

---

Glukose	Merck
Glutaraldehyd	Merck Schuchard
Glycerol	Roth
Glycin	Appli Chem
Glykogen	Sigma
Griess-Reagenz	Sigma
Guanidiniumthiocyanat	Merck
Hefeextrakt	Roth
Interleukin-4	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Carl Roth
L-Glutamin	Pan Biotech
LPS ( <i>Salmonella typhimurium</i> )	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin/Streptomycin	Pan Biotech
Phenol	Merck
QIAzon Lyse Reagenz	Qiagen™
RNase freies Aqua Bidest	Millipore Merck
Salzsäure (37 %ig)	Roth

---

TEMED	Carl Roth
TRIS	Carl Roth
Trizol	Quiagen
Trypanblau-Lösung (0,4%ig)	Sigma
Trypsin	Sigma
Tween 20	Carl Roth

## 2.3 Puffer und Lösungen

Lysepuffer (DNA-Isolierung)	100 mM EDTA, 1 % SDS, 100 mM Tris-HCl, (pH 8.0)
Taq DNA Polymerase Puffer (10x)	GE Healthcare

## 2.4 Medien

Dissoziationslösung	0,024 g HEPES; 0,02 g Trypsin; 0,002 g EDTA; 35 µl DNase (1 mg/ml) / 3 ml Dissoziationslösung, ad 10 ml DMEM (4,5g Glucose /l)
Kulturmedium für Mikroglia	500 ml DMEM (4,5 g Glucose / l; 4 nM L-Glutamin), 60 ml FKS (bei 44-53°C 30 Minuten inaktiviert), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 6 ml Penicillin (10.000 U/ ml), Streptomycin (10 mg/ml PBS)
Stimulationsmedium für Mikroglia	500 ml DMEM (4,5 g Glucose / l, 4 nM L-Glutamin); 60 ml FKS (bei 56°C 30 Minuten inaktiviert); 6 ml Penicillin (10.000 U / ml), Streptomycin (10 mg/ml PBS)

## 2.5 Oligonukleotide (Primer)

Tab. 2.2: Verwendete Oligonukleotide.

NAME:	SEQUENZ (5' - 3')	Tm [°C]
MB_MRC1_F	GGCTGATTACGAGCAGTGGA	59,8
MB_MRC1_R	CGGGGTCACCTTTCAACTCA	59,9
MB_Chi3L1_F	GCCTGACAGATTCAGCAATGT	57,9
MB_Chi3L1_R	CTATGTACTTCAGCTCCTCTG	57,9
MB_IGF-1_F	CGTACCAAAATGAGCGCACC	60,1
MB_IGF-1_R	CCTTGGTCCACACACGAACT	60,1
MB_FcγR2b_F	TTCCGAAGGCTGTGGTGAAA	59,8
MB_FcγR2b_R	TGTAGTTGGCTTGGGCTTGA	59,5

Eukaryotische 18S-rRNA

Hs99999901\_s1

induzierbare NO-Synthase (ROS)

Rn00561646\_m1

## 2.6 Kits

RT<sup>2</sup> First Strand Kit (12)

Qiagen™

RT<sup>2</sup> SYBR® Green ROX™

Qiagen™

RT<sup>2</sup> Profiler qPCR Array™ Custom

Qiagen™

5x HOT FirePol® EVA Green qPCR Supermix

Solis Biodyne

d-NTP-Mix (10 nm)

5 Prime

TaqMan® Universal PCR Mastermix

Life Technologies GmbH

## DNase-Kit:

Promega,USA:

RQ1 RNase-freie DNase  
RQ1 RNase-freie DNase 10x  
Reaktionspuffer  
RQ1 Stopplösung (25mM EDTA)

Random Hexamer Primer

Thermo Scientific, USA

## 2.7 Geräte

## PCR-Maschinen (Thermocycler):

ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR System

Applied Biosystems

GeneAmp® PCR System 2400

Perkin Elmer

GeneAmp® PCR System 9700

Perkin Elmer

## Elektrophoresegeräte:

Gelkammer Spannungsquelle Model 1000/500

Bio-Rad

Gelkammer Model B

PeqLab

## Inkubatoren / Schüttler:

Hera Cell 150

Heraeus

Hera Cell

Heraeus

INCO 2 153

Memmert

Schüttler Ro-10

Gerhardt

Thermomixer Kompakt

Eppendorf

## UV-Geräte:

Fusion SL Vilber Lourmat

Vilber Lourmat

## Photometer und Küvetten:

96-well-Platten Photometer EAR 340 ATTC

SLT Laborinstrumente Austria

Epoch Spectral-Photometer

BioTek

Take3-Multi-Volume-Plate

BioTek

## Zentrifugen:

Centrifuge 5415 R

Eppendorf

Centrifuge 5430

Eppendorf

Centrifuge 5804 R

Eppendorf

Micro Centrifuge IR

Roth

MiniSpin

Eppendorf

## Mikroskope / Binokulare:

Binokular STEMI SV8

Carl-Zeiss

Licht-Wilovert

Hund

## Weitere Gerätschaften:

Feinwaage BP 211 D

Sartorius

Gefrierschrank –20 °C

Siemens, Bosch

Gefrierschrank –80 °C

Heraeus Instruments

Kühlschrank +4 °C

Siemens

Millipore Synergy UV

Merck

---

Neubauer Zählkammer	Carl-Roth
pH-Meter 763 Multi-Calimatic	Knick
Präzisionswaage BP 610	Sartorius
REAX 2000	Heidolph
Sicherheitswerkbank HERASafe®	Heraeus Instruments
Thermoblock TDB-120	Thermostat
Thermomix compact	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt
12-Well Mikrotiterplatten	Sarstedt
96-Well PCR Mikrotiterplatten	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße (200, 500, 1500 µl)	Sarstedt
Multiply Reaktionsgefäße (200 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5ml, 50ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (10ml, 50ml)	Sarstedt
Gewebekulturschälchen (60 x 15 mm)	Sarstedt
Zellschaber (steril)	Sarstedt
75m <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen mit Filterdeckel	Sarstedt
Deckgläser (26 x 26 mm)	Carl Roth
Objektträger (26 x 76 mm)	Carl Roth
Pipettenspitzen, 2,5 – 1000 µl	Sarstedt
Serologische Pipetten 2 – 10 ml	Sarstedt



Pasteurpipetten

Sarstedt

## 2.9 Software

Bildbearbeitung:

Adobe Photoshop cs6

Adobe Illustrator cs6

qPCR Analyse:

ABI Prism 7500 fast Version 2.0.6.

Applied Biosystems

qPCR conversion tool Qiagen™

Sequenzanalyse:

DNAMAN4.15

mRNA-Messung:

Gen5™ Biotek®

Text- & Datenbearbeitung:

Microsoft Office 365 Pro Plus

Literaturverzeichnis:

Mendeley

## 2.10 Datenbanken und Internetseiten

NCBI-BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

NCBI-pubmed  
pubmed/

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Google scholar

<http://www.Google.de>

Qiagen™ Data Analysis Center

[http://www.sabiosciences.com/  
dataanalysis.php](http://www.sabiosciences.com/dataanalysis.php)

### 3 Methoden

#### 3.1 Gewinnung primärer Mikrogliazellen

##### 3.1.1 Isolation und Anzucht von Mikrogliazellen aus *Rattus norvegicus*

Entsprechend der Methode von McCarthy (1980) und modifiziert nach Saura *et al.* (2003) wurden 10 bis 12 Ratten *post-partum* im Entwicklungsstadium P1-P3 zur Isolierung der Mikroglia ausgewählt. Nach deren Dekapitation wurden die Zerebra stumpf aus den Kranien herauspräpariert und in Kulturschälchen mit 1% Penicillin/Streptomycin beimpftem DPBS überführt. Unter dem Binokular wurden die Kortizes und die Mesenzephalien vom restlichen Gehirn getrennt, von den Meningen befreit und in jeweils eigenen Gewebekulturschalen gesammelt. Der Rest der Zerebra wurde verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Gehirnantile mit je 12 ml DPBS erfolgte deren mechanische Zerstückelung. Anschließend wurden je 4 - 5 Kortex Gewebestücke und 5 – 6 Mesenzephalien Gewebestücke verschiedener Zerebra in jeweils 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch die Zugabe von 3 ml trypsinhaltiger Dissoziationslösung sowie 35 µl DNase I und anschließender Inkubation bei 37°C für 30 Minuten unter 8,3% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erfolgte die Mazeration der Gewebe. Zum Abstoppen der Trypsinaktivität wurde den Zellen nach Abnahme der Überstände 2 ml FKS-haltiges Zellkulturmedium mit 50 µl DNase zugesetzt. Durch Resuspension wurden die Zellen weiter vereinzelt und anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt.

Aus diesen Zellkonglomeraten wurden die Zellen aus jeweils ca. 2 Kortizes oder 2 Mesenzephalien in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und dieses dann in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C unter 8,4% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 48h.

##### 3.1.2 Ernte gezüchteter Mikrogliazellen

Nachdem sich in den Zellkulturflaschen nach ca. 9 - 10 Tagen ein konfluenter Astrozyten-Zellrasen gebildet hatte, wurden die Mikrogliazellen geerntet. Dazu schwenkte und schüttelte man die 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen, wodurch sich die Mikroglia aus dem Zellverband lösten und frei im Medium flottierten. Die Mikroglia enthaltenden Zellkulturüberstände wurden in 50 ml

Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zentrifugation bei 1000 x g für 5 Minuten trennte die Mikroglia vom Überstand. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in Kulturmedium resuspendiert und die Mikroglia aus den Kortizes mit denen aus den Mesenzephalien vereint.

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden der Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermengt. Da Trypanblau nicht membrangängig ist, färbten sich nur avitale Zellen mit gestörter Membranintegrität blau. Die vitalen Zellen ließen sich in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop auszählen.

### 3.1.3 Aussaat von Mikrogliazellen zur Stimulation

Um für die Analyse der Genexpression von Mikroglia mittels qPCR genügend mRNA zu Verfügung zu haben, züchtete man die Zellen in einer Dichte von einer Million Zellen pro Well einer 12 Well-Mikrotiterplatte an. Bis zur Zelladhärenz ruhten die Zellen anschließend bei 37°C für 24 Stunden unter 8,4% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank.

## 3.2 Stimulation von primären Mikrogliazellen

Nachdem die Zellen in den 12 Well-Mikrotiterplatte angewachsen waren, wurden die Überstände abgenommen, verworfen und durch 1 ml Kulturmedium, das mit der Stimulationssubstanz versetzt war, ersetzt. Die Stimulationssubstanzen, die Konzentrationen und die jeweiligen Stimulationszeiten richteten sich nach dem Versuchsaufbau (Tabelle 3.1). Die stimulierten Zellen wurden bei 37°C und unter 8,4% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

Tab. 3.1: Stimulationssubstanzen, -konzentrationen und -zeiten

Substanzen	Menge	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h
Kontrolle		# x	# x	# x	# x	# x
LPS (SalTy)	5 ng	# x	# x	# x	# x	# x
IL-4	50 ng	# x	# x	# x	# x	# x
IL-13	25 ng	x	x	x	x	x
IL-4 + IL-13	50 ng + 25 ng	x	x	x	x	x
LPS + TFF3	5 ng + 50 ng	x	x	x	x	x
IL-4 + TFF3	50 ng + 50 ng	x	x	x	x	x
IL-13 + TFF3	25 ng + 50 ng	x	x	x	x	x
IL-4 + IL-13 + TFF3	50 ng + 25 ng + 50 ng	x	x	x	x	x

# - Qiagen RT<sup>2</sup> Profiler™ Platten; x - Einzelplattenversuche

### 3.3 RNA-Isolation

Um die zur Herstellung der cDNA benötigte RNA aus den stimulierten Mikrogliazellen zu isolieren, kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Für den Einsatz der cDNA in Versuchen mit den RT<sup>2</sup> Profiler 96-well Platten von Qiagen™ wurde die RNA mit dem NucleoSpin® Mini Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Die cDNA für den Einsatz in Einzelplatten-Versuchen stammte von RNA, die mithilfe der von Chomczynski und Sacchi im Jahre 1987 beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert wurde (Chomczynski 1987; Chomczynski und Sacchi 2006). In beiden Versuchsansätzen wurden jeweils zwei Wells, die auf dieselbe Art stimuliert waren, nach der Lyse der Zellen vereinigt. So stammte die isolierte RNA aus 2 Millionen Zellen, womit höhere RNA-Konzentrationen erreicht werden konnten.

### 3.3.1 RNA-Isolation mit dem NucleoSpin® Mini Kit

Um mögliche Verunreinigungen durch das bei der Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA zum Einsatz kommende QIAzol *Lysis Reagent*™ zu vermeiden und eine dadurch bedingte Beeinträchtigung des sensiblen Reaktionssystems der RT<sup>2</sup> Profiler 96-well™ Platten zu verhindern, kam das NucleoSpin® Mini Kit von Macherey-Nagel zum Einsatz.

Nach Herstellerangaben, die für diese Arbeit verändert wurden, wurden die stimulierten Zellen zunächst zweimalig mit je 1 ml PBS gewaschen. Das anschließende Ablösen der adhären Zellen vom Boden des Kulturschälchens erfolgte durch die Zugabe von 0,3 % Trypsin in 1 ml PBS. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Durch Abkratzen mit einem sterilen Spatel und anschließendem Durchmischen mit einer Pipette lösten sich die Zellen aus den Kulturschälchen und ließen sich in Mikroreaktionsgefäße überführen. Nach der Vereinigung von Zellsuspensionen zweier gleich stimulierter Wells in einem Mikroreaktionsgefäß trennten sich die schwereren Zellbestandteile inklusive der RNA durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 x g vom Überstand. Dieser wurde verworfen und durch 350 µl RA-1 Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol ersetzt. Durch kurzes Mischen löste sich das Zellpellet und die Lyse der Zellen wurde beschleunigt. Eine einminütige Zentrifugation bei 11.000 x g über den violetten NucleoSpin™ Filter reinigte das Zelllysate anschließend von größeren Zellbestandteilen. Nach der Zugabe von 350 µl 70% EtOH und Mixen durch auf- und abpipettieren ließ sich das Filtrat auf die Silikamembran eines blauen NucleoSpin™ Filters geben. Während das Filtrat diesen Filter durch Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 11.000 x g passierte, band die RNA an die Silikamembran. Die folgende Zugabe von 350 µl MDB und anschließende Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 x g entsalzte die Membran. Durch die Inkubation der Membran mit 95 µl DNase für 15 Minuten bei RT wurden DNA Reste beseitigt, die sich noch im Filter befanden. Anschließendes sukzessives Waschen der Membran mit 200 µl RAW-2 bzw. 600 µl RA-3 und intermittierender Zentrifugation für je 30 Sekunden bei 1000 x g reinigte die Membranen. In einem vorletzten Schritt trocknete die Membran durch die Zugabe von 250 µl RA-3 und Zentrifugation für 2 Minuten bei 11.000 x g. Die RNA ließ sich abschließend durch die Zugabe von 25 µl RNase freiem Millipore™ Wasser und Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 x g aus der Membran lösen und in einem Mikroreaktionsgefäß sammeln. Auf diese Weise ließen sich in einem Gesamtvolumen von 25 µl RNA Konzentrationen von 120 - 250 ng/µl erzielen.

### 3.3.2 RNA-Isolation durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die stimulierten Zellen nach zweimaligem Waschen mit DPBS zunächst in 800 µl QIAzol *Lysis Reagent*<sup>™</sup> aufgenommen. QIAzol, ein Gemisch aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol, lysierte die dem Boden der 12-Well Kulturschalen anhaftenden Mikrogliazellen, wodurch sie sich mittels eines sterilen Spatels vom Untergrund ablösen ließen. Nach mehrmaligem Durchmischen wurden die Zellfragmentsuspensionen zweier Wells, die mit denselben Stimulationsbedingungen behandelt waren, vereinigt, in 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl Chloroform mit nachfolgendem Schütteln für 15 Sekunden mischten sich die verschiedenen Bestandteile der Suspension. Im Anschluss an eine weitere 2 – 3 - minütige Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g und 6 °C. Dabei trennte sich die Suspension in verschiedene Phasen auf. In der unteren, phenol- und chloroformhaltigen, organischen Phase und in der mittleren Interphase sammelten sich die denaturierten Proteine sowie die DNA. Aufgrund des sauren pH-Wertes des Lyse-Reagenz' setzte sich die RNA in der oberen wässrigen Phase ab. Diese wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 1 µl Glykogen sowie 500 µl Isopropylalkohol und anschließendem Mischen erfolgte eine Inkubation von 10 Minuten bei RT. Während der folgenden 10 - minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g und 6 °C lagerte sich die RNA als Pellet am Boden des Mikroreaktionsgefäßes ab. Das Waschen des Pellets mit 1 ml 75% EtOH befreite die RNA nach dem Verwerfen des Überstandes von Rückständen der vorangegangenen Prozedur. Erneutes Mischen und 5 - minütiges Zentrifugieren bei 7600 x g und 6 °C konzentrierte die RNA erneut am Boden des Mikroreaktionsgefäßes. Das Pellet trocknete nach dem erneuten Verwerfen des Überstandes bei RT, bevor es in 25 µl RNase- freiem Millipore<sup>™</sup> Wasser resuspendiert wurde. Nach letztmaligem 10 - minütigem inkubieren bei 57 °C und kurzem Zentrifugieren bei 5000 x g bei RT ließen sich in einem Gesamtvolumen von 25 µl RNA Konzentrationen von 80 - 150 ng/µl erzielen.

### 3.4 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von sich in Lösung befindlichen Nukleinsäuren genau bestimmen zu können, kam das Gerät *Epoch*<sup>®</sup> der Firma BioTek zum Einsatz.

Dabei wurden zur Kalibrierung je 2 µl RNase freies Millipore<sup>™</sup> Wasser auf die Felder A1 und A2 einer *Take3-Multi-Volume-Plate*<sup>™</sup> gegeben. Die zu testenden Proben trug man auf den folgenden Feldern B1 bis H2 auf. Nach dem Verschluss der *Take3-Multi-Volume-Plate*<sup>™</sup> wurde diese in den *Epoch*<sup>®</sup>-Tray geladen und die Software Gen5<sup>™</sup> Version 1.10.8 gestartet. Das Gerät maß die Extinktion der Probe bei der RNA- und DNA-spezifischen Absorption von 260 nm. Um eine Verunreinigung der Proben, die gemessen wurden, durch möglicherweise vorhandene Aminosäuren auszuschließen, wurden die Proben zudem mit der für manche Aminosäuren spezifischen Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gab Aufschluss über den Reinheitsgrad der Probe. So repräsentierten Quotienten von 1,8 und 2,0 eine reine DNA-, bzw. RNA-Probe.

Nach der Konzentrationsbestimmung konnte die RNA bei -70°C zur späteren Verfügung eingelagert oder direkt folgenden Experimenten zugeführt werden.

### 3.5 cDNA-Synthese

Um die isolierte RNA in der qPCR einsetzen zu können, musste sie zuvor in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Zu diesem Zweck kam eine Reverse Transkriptase (RT) zum Einsatz, ein Enzym, das ursprünglich aus Retroviren stammt. Die Reverse Transkriptase nutzt dabei die mRNA als Matrize, um einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

In den folgenden Experimenten kamen zwei unterschiedliche Kits zur Synthese der cDNA zur Anwendung. Die für die Versuche mit dem RT<sup>2</sup> Profiler qPCR Array<sup>™</sup> benötigte cDNA wurde unter Zuhilfenahme des RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Synthese Kit<sup>™</sup> hergestellt. Für den Einsatz in den Einzelplattenversuchen wurde die cDNA mit Hilfe des Random Hexamer Kits<sup>™</sup> erzeugt.

### 3.5.1 Synthese mit dem RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Synthese Kit

Die für den Einsatz mit dem RT<sup>2</sup> Profiler Custom qPCR Array™ (CAPR12559; Qiagen™) benötigte cDNA wurde gemäß den Angaben im folgenden Protokoll (Tabelle 3.2) synthetisiert. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, betrug die eingesetzte mRNA-Menge jeweils 1,5 µg pro Probe. Auf diese Art und Weise ließ sich pro Ansatz ein Endvolumen von 55,5 µl cDNA synthetisieren.



Tab.: 3.2 RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Synthese Kit™ (Qiagen™)**Vorzubereitendes Material:****Lagerung bei:**

» Proben RNA (1,5µg RNA pro Probe und pro 96-well-Platte)	-70 °C
» GE Puffer (genomic DNA <u>e</u> limination)	-20 °C
» 5x BC3 Puffer	-20 °C
» RE3 Reverse Transcriptase Mix	-20 °C
» P2 Kontrolle	-20 °C
» RNase freies Wasser	-20 °C

Protokoll:	Menge:	Zeit:	Temperatur:
» auftauen der Reaktionslösungen » mischen & kurz zentrifugieren  » <u>Ansatz des DNA elimination mix (1x pro Probe)</u> Proben RNA GE Puffer RNase freies Wasser (auffüllen auf 10 µl) ----- Gesamtvolumen	1,5 µg 1,0 µl X µl 5 µl	15 – 30 sec	25 °C
» Ansatz durch auf und ab pipettieren mixen » kurz zentrifugieren » <i>DNA elimination mix</i> inkubieren » sofort auf Eis geben  » <u>Ansatz des Reverse Transcriptase mix (1x)</u> 5x BC3 Puffer P2 Kontrolle RE3 Reverse Transcriptase Mix RNase freies Wasser ----- Gesamtvolumen	2 µl 0,5 µl 1 µl 1,5 µl 5 µl	5 min mind. 1 min	42 °C

Protokoll:	Menge:	Zeit:	Temperatur:
» gebe zu jedem <i>DNA elimination mix</i> (pro Probe) 5 µl des <i>Reverse Transcriptase mix</i> » durch auf und ab pipettieren mixen » inkubieren » danach sofort die Reaktion stoppen » füge jedem Ansatz RNase freies Wasser hinzu » durch auf und ab pipettieren mixen » Proben auf Eis geben  » Mit qPCR Protokoll fortfahren     ODER » Proben einfrieren	45,5 µl	15 min 5 min	42 °C 95 °C      -20 °C

Pro eingesetzter Probe wurde ein (1x) *Reverse Transkriptase mix™* benötigt. Für den Ansatz einer Reaktionslösung für mehrere Proben wurden Mastermix Ansätze entsprechend der in Tabelle 3.3 angegebenen Werte verwendet.

Tab. 3.3     Master-Mix Ansätze für mehrere Proben:

Ansatz des <i>Reverse Transcriptase mix™</i> :	1x	2x	4x	6x
5x BC3 Puffer	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl
P2 Kontrolle	0,5 µl	1 µl	2 µl	3 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	1 µl	2 µl	4 µl	6 µl
RNase freies Wasser	1,5 µl	3 µl	6 µl	9 µl
Gesamtvolumen	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl

### 3.5.2 Synthese mit dem Random Hexamer-Kit

Die für die qPCR Einzelplatten Experimente benötigte cDNA wurde mit Hilfe des Random Hexamer Kits aus der isolierten RNA synthetisiert. Um konsistent vergleichbare Ergebnisse zu erzielen war es notwendig, cDNA mit jeweils derselben Konzentration für die qPCR einzusetzen. Die isolierte RNA wurde aus diesem Grund zunächst mit so viel RNase freiem Millipore™ Wasser versetzt, dass eine Verdünnung mit einer Konzentration von  $1\mu\text{g}/25\mu\text{l}$  Wasser entstand. Durch weitere Verdünnung im Verhältnis 1:5 ergab sich eine Suspension mit einer Konzentration von  $8\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Dieser Verdünnung war Ausgangspunkt für die Synthese der cDNA.

Um die Möglichkeit einer Beeinträchtigung der qPCR durch DNA Kontamination zu minimieren, wurde zunächst ein DNA Verdau durchgeführt. Durch Inkubation von  $8\mu\text{l}$  der  $8\text{ ng}/\mu\text{l}$  RNA-Verdünnung mit je  $1\mu\text{l}$  DNase Reaktions Puffer und  $1\mu\text{l}$  DNase (Promega) bei  $37^\circ\text{C}$  für 10 Minuten wurden möglicherweise noch vorhandene DNA-Reste entfernt. Die Überführung des Reaktionsansatzes auf Eis sowie die anschließende Zugabe von  $1\mu\text{l}$  RQ-1 Stopplösung (EDTA 25 mM) und Inkubation bei  $65^\circ\text{C}$  für 10 Minuten inaktivierte die DNase.

Die Zugabe von  $1\mu\text{l}$  Random Hexamer Primer und darauffolgender Inkubation bei  $70^\circ\text{C}$  für 5 Minuten führte zur Hybridisierung der Primer an die RNA-Matrix. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz des Random Hexamer-Transcriptase-Mix entsprechend den Angaben in Tabelle 3.4 angesetzt und mit der RNA Lösung vermengt. Eine Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  für 5 Minuten stellte die richtige Reaktionstemperatur ein, bevor  $1\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase hinzugegeben wurden. Der Reaktionsansatz wurde mit dem in Tabelle 3.5 angegebenen Protokoll im PCR-Cycler inkubiert. Die synthetisierte cDNA konnte bei  $-20^\circ\text{C}$  für mehrere Wochen gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Tab. 3.4: Reaktionsansatz des *Random Hexamer-Transkriptase-Mix* (1x)

Komponente	Volumen	
5x Reaktions Puffer	4,0	µl
dNTP-Mix (10mM))	2,0	µl
RNase freies Wasser (kein DEPC-H <sub>2</sub> O)	1,0	µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>7,00</b>	<b>µl</b>

Tab. 3.5: Inkubationszeiten und -temperaturen der Random Hexamer PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit (Minuten)
Primer annealing	25 °C	10
Reverse Transkription	42 °C	60
Enzymdeaktivierung	70 °C	10

### 3.6 Standard-PCR

Mit Hilfe des technischen Verfahrens der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich bereits sehr geringe Mengen spezifischer DNA-Fragmente *in vitro* vervielfältigen. Dieser Prozess läuft in drei Schritten ab: die Denaturierung, die Primerhybridisierung und die Elongation.

In der Phase der Denaturierung werden die eingesetzten helikal verdrehten und doppelsträngigen DNA-Fragmente bei einer Temperatur von ca. 94 °C entwunden und in Einzelstränge aufgetrennt. Während der Primer Hybridisierung wird die Temperatur auf eine Primer-spezifische Schmelztemperatur ( $T_m$ ) abgesenkt, wobei die eingesetzten Primer an den zu ihnen komplementären spezifischen Sequenzen der einzelsträngigen DNA hybridisieren. In der dritten Phase der Reaktion, der Elongation, bindet eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Hot Master *Taq*-Polymerase), die ursprünglich aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Morley 1995) stammt, an die hybridisierten Primersequenzen. Bei einer Reaktionstemperatur von 58-65 °C wird durch das Einfügen von zum Leitstrang komplementären Nukleotiden durch die Polymerase ein neuer zur DNA-Matrize komplementärer DNA-Einzelstrang synthetisiert. Die Elongationsdauer wird dabei mit einer Minute pro tausend synthetisierten Basenpaaren berechnet. Durch das wiederholte Durchlaufen dieser drei Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des eingesetzten DNA-Fragments. Da in jedem Reproduktionszyklus Fehler auftreten können, sollte die maximale Anzahl der Reproduktionszyklen auf 40 Zyklen begrenzt sein.

#### 3.6.1 Primer Funktionalitätsprüfung

Die Standard-PCR wurde während dieser Arbeit eingesetzt, um die Funktion der ausgewählten spezifischen Primer für die Einzelplattenversuche zu evaluieren (siehe Kapitel „2.6 Oligonukleotide (Primer)“). Der Ansatz der Primer erfolgte zu diesem Zweck in einer 1:10 Verdünnung einer 10 µM Primer Stammlösung. Um die Wahrscheinlichkeit einer Bindung der Primer an ihre komplementären cDNA Sequenzen zu erhöhen, stammte die ausgewählte cDNA zu gleichen Anteilen aus nicht stimulierten, aus mit LPS stimulierten und aus mit IL-4 stimulierten Mikrogliazellen. Die Mastermixe wurden als ein Vielfaches des in Tabelle 3.6

aufgeführten Reaktionsansatzes und entsprechend der in Tabelle 3.7 aufgezählten Reaktionsschritte pipettiert bzw. im Thermocycler prozessiert.

Tab. 3.6: Reaktionsansatz einer Standard-PCR (1x)

Komponente	Volumen
Millipore Wasser	4,2 µl
Hot Master Taq Polymerase Puffer 5x	2,0 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Primer A forward [1 µM]	1,0 µl
Primer B reverse [1 µM]	1,0 µl
cDNA [1:20 verdünnt]	1,0 µl
Hot Master Taq Polymerase	0,3 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl

Tab. 3.7: Reaktionsbedingungen einer Standard-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit [min.]
Initiale Denaturierung	94 °C	5:00
35 Amplifikationszyklen		
Denaturierung	94 °C	0:30
Primerhybridisierung	59 °C	0:45
Elongation	72 °C	0:30
Terminale Elongation	72 °C	7:00
Lagerung bis Herausnahme aus dem Cycler	4 °C	∞

### 3.7 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) lässt sich verwenden, um die Expressionsstärke einzelner Gene in Echtzeit zu bestimmen. Die Technik basiert auf dem Prinzip der Standard-PCR in Kombination mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung. Abhängig vom verwendeten Verfahren stammt die Fluoreszenz entweder von mit der DNA unspezifisch interkalierenden Farbstoffen oder von fluoreszenzmarkierten spezifischen Primer-Sonden.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Cyanin-Farbstoff SYBR Green I bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA), wobei er vor allem blaues Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 494$  nm absorbiert und grünes Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 521$  nm emittiert. Durch Messung dieses Lichtes am Ende der Elongation lassen sich Rückschlüsse auf die eingesetzte DNA Menge ziehen, da die Emission mit jedem PCR-Zyklus proportional zu der Menge an gebundener DNA steigt. Aufgrund der unspezifischen Einlagerung des verwendeten Farbstoffs SYBR Green I in dsDNA muss diese Messmethode häufig angepasst werden, um die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse durch Amplifikation von zufälligen DNA Sequenzen zu minimieren. Zu diesem Zweck wird nach jedem PCR Zyklus eine Schmelzkurvenanalyse eingefügt. Dabei wird die Temperatur langsam von ca. 50°C auf 95°C angehoben und die Veränderung der Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. In Abhängigkeit von ihrer Länge und ihrer Basenzusammensetzung hat dsDNA eine bestimmte Schmelztemperatur, bei welcher sie sich in ihre beiden Einzelstränge auftrennt. Der gebundene Farbstoff wird freigegeben und die Fluoreszenz lässt nach. In Kombination mit spezifischen Primern für die untersuchten Gene lassen sich so valide Aussagen über die eingesetzte DNA-Menge und somit über die Expressionsaktivität der untersuchten Zellen machen.

#### 3.7.1 RT<sup>2</sup> Custom qPCR Array™

In dieser Versuchsreihe kam die qPCR zum Einsatz, um in einem ersten ‚*unbiased screening*‘ die Stärke der Expression von ausgewählten potenziellen Markergenen unter bestimmten Stimulationsbedingungen in Mikrogliazellen zu testen. Dies diente der Identifikation von Genen, die zur Markierung von Mikrogliazellen genutzt werden können, welche sich in verschiedenen Aktivitätsstadien befinden.

Die folgenden Tabellen 3.8, 3.9 und 3.10 listen die verwendeten potenziellen Markergene entsprechend ihrer vermuteten Gruppenzugehörigkeit mitsamt der entsprechenden RefSeq-Nummer auf, außerdem werden die verwendeten Kontroll-Gene angegeben.

Tab. 3.8      Potenzielle anti-inflammatorische Markergene

<b>Gen Name</b>	<b>RefSeq-Nummer</b>	<b>Gen Name</b>	<b>RefSeq-Nummer</b>
Arg1	NM_017134	CX3CR1	NM_133534
CCL2	NM_031530	Retnla (FIZZ1)	NM_053333
CCL22	NM_057203	Lgals3	NM_031832
CCR2	NM_021866	IGF-1	NM_178866
CD163	NM_001107887	IL-10	NM_012854
CD200	NM_031518	IL-1R $\alpha$	NM_022194
CD200R	NM_023953	MACROD2	NM_139337
MSR1 (CD204)	NM_001191939	MMP12	NM_053963
Mrc1 (CD206)	NM_001106123	NGF	NM_001277055
CD209	XM_006221228	SOCS3	NM_053565
Fc $\epsilon$ R2 (CD23)	NM_133550	TGF- $\beta$	NM_021578
CD36	NM_031561	Chi3L3 (YM1)	NM_001191712
CHI3L1	NM_053560	TIMP	NM_053819



Tab. 3.9      Potenzielle pro-inflammatorische Markergene

Gen Name	RefSeq-Nummer	Gen Name	RefSeq-Nummer
Fcγr2a (CD16)	NM_053843	IL-12	NM_022611
FcγR2b (CD32)	NM_175756	il12 a	NM_053390
Fcγr1a (CD64)	NM_001100836	IL-1α	NM_017019
CD80	NM_012926	IL-1β	NM_031512
CD86	NM_020081	IL-2	NM_053836
Ptgs2 (Cox-2)	NM_017232	IL-6	NM_012589
CXCL1 (KC)	NM_030845	NOS2	NM_012611
IFN-γ	NM_138880	TNF-α	NM_012675

Tab. 3.10      Verwendete Kontrollgene

Gen Name	RefSeq-Nummer	Gen Name	RefSeq-Nummer
Actb	NM_031144	RGDC	RGDC
HPRT1	NM_012583	RTC	SA_00104
18s rRNA	X01117	PPC	SA_00103

### 3.7.1.1 Plattendesign

Um die Expression der ausgewählten Gene in einer qPCR untersuchen zu können, mussten die zugehörigen Primer-Paare auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen und anschließend in einem qPCR-Cycler ausgewertet werden. Infolge des Umfangs des angestrebten ‚*unbiased screenings*‘ sowie aufgrund der nicht möglichen kommerziellen Erwerbbarkeit des ausgewählten Sets an Genen wurde ein maßgeschneidertes („*custom*“) Platten-Array entworfen und bei Qiagen™ in Auftrag gegeben. Unter der Katalognummer CAPR12559 sind die Platten bei Qiagen™ nachbestellbar. Um eine ausreichend hohe Anzahl an Wiederholungen der Versuche zur bestmöglichen Reliabilität bei gleichermaßen gerechtfertigter Wirtschaftlichkeit einzuhalten, wurden insgesamt 42 verschiedene potenzielle Markergene ausgewählt. Davon waren 26 als potenziell anti-inflammatorisch und 16 als mögliche pro-inflammatorische Gene vorbeschrieben. Neben den 42 potenziellen Markergenen wurden noch die in Tabelle 3.10 angegebenen Kontrollgene ausgewählt.

Die Primer dieser 48 Gene wurden durch Qiagen™ gemäß dem in Abb. 3.1 dargestellten Plattendesign auf 24 RT<sup>2</sup> Custom qPCR Array™ 96-Well Mikrotiterplatten aufgetragen und lyophilisiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Arg 1	MRC 1	Igf 1	Chi3l3	CxCl1	NOS 2	Arg 1	MRC 1	Igf 1	Chi3l3	CxCl1	NOS 2
B	CCL 2	CD 209c	IL 10	Timp 1	IFN g	TNF	CCL 2	CD 209c	IL 10	Timp 1	IFN g	TNF
C	CCL 22	FcEr 2	IL 1rn	FcGr2a	IL 12b	Act b	CCL 22	FcEr 2	IL 1rn	FcGr2a	IL 12b	Act b
D	CCR 2	CD 36	MacroD1	FcGr2b	IL 12a	HPRT 1	CCR 2	CD 36	MacroD1	FcGr2b	IL 12a	HPRT 1
E	CD 163	Chi3l1	MMP 12	FcGr1a	IL 1a	18s rRNA	CD 163	Chi3l1	MMP 12	FcGr1a	IL 1a	18s rRNA
F	CD 200	Cx3Cr1	NGF	CD 80	IL 1b	RGDC	CD 200	Cx3Cr1	NGF	CD 80	IL 1b	RGDC
G	CD 200r1	Retnla	Socs 3	CD 86	IL 2	RTC	CD 200r1	Retnla	Socs 3	CD 86	IL 2	RTC
H	MSR 1	Lgals 3	TGF b	Ptgs 2	IL 6	PPC	MSR 1	Lgals 3	TGF b	Ptgs 2	IL 6	PPC

**Abbildung 3.1: RT<sup>2</sup> Custom qPCR Array™ 96-Well Mikrotiterplatten Layout:** Die RT<sup>2</sup> Custom qPCR Array™ 96-Well Mikrotiterplatten waren nach folgendem Layout aufgebaut. Pro Platte konnte cDNA von zwei unterschiedlich Stimulierten Mikrogliazellpopulationen aufgetragen werden (1. orange, 2. blau). Pro cDNA-Set waren die Platten mit den Haushaltsgenen Actin Beta (Act-β), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT 1) und 18S rRNA bestückt. Zudem waren die internen Kontrollen Rat Genomic DNA Control (RGDC) und Reverse Transcriptase Control (RTC) aufgetragen (violett).

3.7.1.2 RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Protokoll

Gemäß dem in Tabelle 3.11 angegebenen Protokoll wurden die RT<sup>2</sup> Custom qPCR Array™ 96-Well Mikrotiterplatten mit der cDNA beladen, die aus dem RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Synthese Kit™ (QIAGEN) stammt. Am Thermocycler wurden die angegebene Softwareeinstellung verwendet, um die Expressionsstärke der Gene zu bestimmen (siehe Tab.:3.11).

Pro eingesetzter Probe, d.h. pro 48 Wells wurde ein (1x) SYBR GREEN ROX qPCR Mastermix benötigt. Für den Ansatz einer Reaktionslösung für zwei Proben (2x) wurden Mastermix Ansätze entsprechend den in Tabelle 3.12 angegebenen Werten verwendet.

Tab. 3.11 RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Array™**Vorzubereitendes Material (pro Probe (\* s.u.)):****Lagerung bei:**

» RT <sup>2</sup> First Strand Proben cDNA (55,5 µl pro 48-wells pro Probe)	-20 °C
» 2x SYBR Green ROX qPCR Mastermix (** s.u.)	-20 °C
› HotStart DNA <i>Taq</i> Polymerase	
› PCR Puffer	
› dNTP mix	
› SYBR Green dye	
› ROX passive reference dye	
» RNase freies Wasser	-20 °C
» RT <sup>2</sup> Profiler Custom PCR-Array™ Platten (96-well; Layout: siehe Anhang)	-20 °C

<b>Protokoll:</b>	<b>Menge:</b>	<b>Zeit:</b>	<b>Temperatur:</b>
» auftauen des SYBR Green Mastermix (falls Präzipitat vorhanden, inkubieren)		1 min	25 °C
» mischen & kurz zentrifugieren		10 - 15 sec	42 °C
» <u>Ansatz der PCR-Reaktion / 48-well Pl. (Pro Probe)</u>			
2x SYBR Green ROX qPCR Mastermix	675 µl		
RT <sup>2</sup> First Strand Proben cDNA	51 µl		
RNase freies Wasser	624 µl		
Gesamtvolumen (***) s.u.)	1350 µl		
» Ansatz durch leichtes auf und ab pipettieren mixen			

» benötigte Anzahl an PCR-Array Platten vorsichtig aus verschlossener Tasche nehmen, nicht invertieren!			
» PCR-Reaktion auf custom-96-well Platte aliquotieren (für 1 Probe (48 wells) - <b>Plattenlayout beachten!!!</b> )	je 25 µl		
» 96-well Platte mit Folie verschließen			
» Platte zentrifugieren bei 1000 x g (falls Blasen vorhanden, den Schritt wiederholen)		1 min	RT
» Platte auf Eis stellen (**** s.u.)			
» Cycler Programm einstellen ( <u>siehe unten</u> )			
» Platten in ABI 7500 Fast Cycler stellen			
» rt-qPCR starten			

**Protokoll:**


---



---

**• Folgendes Cycler-Programm einstellen:**

- Alle Daten unter festgelegtem Pfad speichern
- › ABI 7500 Software und ABI 7500 FAST cycler starten
- › „Advanced setup“ auswählen
- » Klick „Experiment Properties“:
  - › Experiment benennen
  - › Instrument auswählen (7500 FAST; 96 wells)
  - › Experiment-Typ auswählen (Quantitation-Standard Curve)
  - › Reagentien auswählen (SYBR Green)
  - › „Ramp Speed“ auswählen (~ 2 Stunden zur Fertigstellung)
- » Klick „Plate Setup“:
  - › “Assign Targets and Samples” auswählen
  - › Die gesamte Platte Auswählen, Target 1
  - › Kontrollieren ob alle wells mit „U“ markiert sind
- » Klick „Run Method“:
  - › Kontrollieren ob die „data capturing“ Icons aktiviert sind bei:
    - i. „cycling Stage“: 60°C (1 Minute Schritt)
    - ii. “melting curve stage”: während der Rampenphase von 60°C bis 95°C
  - › „reaktion volume“ auf 25 µl einstellen
  - › „number of cycles“ auf 40 einstellen
- » Klick „Start Run“

- \* Pro RT<sup>2</sup> Profiler Custom PCR-Array 96-well Platte können 2 Proben ausgewertet werden. D.h. pro Platte stehen jeder Probe 48 *wells* zur Verfügung. Die im Protokoll angegebenen Mengen beziehen sich nur auf eine Probe. Soll die gesamte Platte bestückt werden müssen die unten angegebenen Mengen verwendet werden.
- \*\* SYBR Green Mastermix enthält eine HotStart DNA *Taq* Polymerase, die erst nach Hitze-Aktivierung aktiv ist. Aus diesem Grund können alle Reaktionsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden.
- \*\*\* Ein Überschussvolumen von 150 µl ist hier bereits einberechnet.
- \*\*\*\* Die Platten, die in Aluminiumfolie eingewickelt sind, können ab diesem Punkt bis zu einer Woche bei -20°C gelagert werden.

Tab.: 3.12    Ansatz der PCR-Reaktionen für 1 Probe (48 *wells*) oder  
2 Proben (96 *wells*):

	48 wells	96 wells
Ansatz der PCR-Reaktion:		
2x SYBR Green ROX qPCR Mastermix	675    µl	1350    µl
RT <sup>2</sup> First Strand Proben cDNA	51    µl	102    µl
RNase freies Wasser	624    µl	1248    µl
Gesamtvolumen	1350    µl	2700    µl

### 3.7.1.3 Platten- und Datenauswertung

Nachdem die qPCR abgeschlossen war, mussten die gewonnenen Daten weiter prozessiert werden, um sie in das benötigte Format zur endgültigen Auswertung zu überführen.

Da die Ergebnisse der Experimente über den gesamten Zeitraum der Versuche vergleichbar sein sollten, wurde der Schwellenwert (*threshold*) der synthetisierten DNA-Menge (repräsentiert durch die Stärke der gemessenen Fluoreszenz) auf 0,03 gesetzt. Bei Erreichen dieses Wertes wurde der Ct-Wert jeder einzelnen Probe registriert, d.h. es wurden die Anzahl der Zyklen notiert, bei der die Fluoreszenz als Repräsentant der Menge an synthetisierter DNA den eingestellten *threshold* überstieg. Die auf diese Weise gewonnenen Ct-Werte wurden mit Hilfe des Excel basierten *qPCR Conversion Tools* von Qiagen™ in das richtige Format überführt und in Tabellenform im Qiagen™ *Data Analysis Center* (siehe Kapitel 2.10 Datenbanken und Internetseiten) hochgeladen. Dort wurden die Ct-Werte (dem Herstellerprotokoll folgend) zunächst im Proben Manager den entsprechenden Stimulations-Gruppen Kontrolle (KO), LPS oder IL-4 zugeordnet. Der Ct *Cut-off* Wert war auf 35 Zyklen gesetzt. Nach der Übernahme dieser Einstellungen erfolgte die Qualitätskontrolle der gewonnenen Daten. Mithilfe der auf den RT<sup>2</sup> custom qPCR Platten aufgebrachten Kontrollen für *Rat Genomic DNA Contamination* (RGDC), *Reverse Transcriptase* (RTC) und *Positive PCR* (PPC) wurde überprüft, ob die Platten mit genomischer DNA kontaminiert waren, ob die reverse Transkriptase ordnungsgemäß funktionierte und ob die PCR wie vorgeschrieben abgelaufen war. Die Normalisierung der Ct-Werte erfolgte dadurch, dass die Ct-Werte mit den manuell ausgewählten Haushaltsgenen Actin-Beta (Act-β), HPRT1 und 18S-rRNA in Relation gebracht wurden.

Nach Abschluss dieser Prozessierung wurden die gewonnenen Ct-Werte lokal gespeichert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in Microsoft Excel®.

### 3.7.2 SOLIS BioDyne® Einzelplatten qPCR

#### 3.7.2.1 Plattendesign

Nachdem das ‚*unbiased screening*‘ mit den RT<sup>2</sup> custom Profiler PCR-Platten abgeschlossen war, wurden die Experimente für ein Set aus ausgewählten Genen auf Einzel qPCR-Platten wiederholt. Pro 96-Well Platte wurde ein Mastermix für jeweils eines der ausgewählten Gene (MRC1, Chi3L1, IGF-1, FcγR2b sowie dem Kontrollgen GAPDH) entsprechend dem in Tabelle 3.13 angegebenen Protokoll angesetzt. Je 15 µl des Mastermix wurden in jedes Well der Platte pipettiert. 2 µl der benötigte cDNA wurde im Anschluss in die jeweiligen Wells gegeben, dem in Abbildung 3.2 dargestellten Plattenlayout entsprechend. Zuvor war die cDNA auf eine Konzentration von 8 ng/µl vorverdünnt worden. Die cDNA stammte aus Mikrogliazellen die für 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden mit verschiedenen Substanzen stimuliert oder mit Gemischen von Substanzen ko-stimuliert waren. Für jeden Stimulationszeitraum wurden pro Platte zwei technische Replikate derselben cDNA auf die Platte pipettiert. Bei den getesteten Substanzen handelte es sich neben einer Zellmedium-Kontrolle und einer Wasserkontrolle um LPS, IL-4, IL-13 sowie um die Ko-Stimulation mit LPS + TFF3, IL-4 + TFF3, IL-13 + TFF3, IL-4 + IL-13 + TFF3 sowie um IL-4 + IL-13. Für jede Stimulationssubstanz wurden zwei biologische Replikate angefertigt.

Tab. 3.13: SOLIS BioDyne® SYBR Green Mastermix

Komponente	Volumen (1x)	Volumen (96x)
5x HOT FIREpol® EvaGreen® qPCR Supermix	3,0 µl	288 µl
Primer A forward [10 µM]	1,25 µl	120 µl
Primer B reverse [10 µM]	1,25 µl	120 µl
Millipore™ Wasser	7,5 µl	720 µl
Gesamtvolumen	13,0 µl	1248 µl

	4h	4h	6h	6h	8h	8h	12h	12h	24h	24h	entsprechende Zeit	
	1. technisches Replikat	2. technisches Replikat	1. technisches Replikat	2. technisches Replikat	1. technisches Replikat	2. technisches Replikat	1. technisches Replikat	2. technisches Replikat	1. technisches Replikat	2. technisches Replikat	1. technisches Replikat	2. technisches Replikat
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	IL-4 + IL-13 + TFF3	IL-4 + IL-13 + TFF3
B	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4 + IL-13 + TFF3	IL-4 + IL-13 + TFF3
C	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-13	IL-4 + IL-13 + TFF3	IL-4 + IL-13 + TFF3
D	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	IL-4 + IL-13 + TFF3	IL-4 + IL-13 + TFF3
E	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + TFF3	IL-4 + IL-13 + TFF3	IL-4 + IL-13 + TFF3
F	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	IL-13 + TFF3	H <sub>2</sub> O KO	H <sub>2</sub> O KO
G	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	LPS + TFF3	H <sub>2</sub> O KO	H <sub>2</sub> O KO
H	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	IL-4 + IL-13	H <sub>2</sub> O KO	H <sub>2</sub> O KO

**Abbildung 3.2: Solis BioDyne Einzelplatten Layout:** Für die Einzelplatten-qPCR Versuche wurde die cDNA der stimulierten Zellen nach diesem Schema auf eine mit jeweils einem der folgenden Primer (MRC1, Chi 3L1, IGF-1, FcγR2b, GAPDH) vorgeladenen 96-Well Platten aufgetragen. Es wurden jeweils 2 technische Replikate aufgetragen.

Nach dem Auftrag der cDNA auf die Platten wurde diese mit einer Folie versiegelt, bei Raumtemperatur und 500 x g für eine Minute zentrifugiert um Blasen zu entfernen und dann im ThermoCycler plaziert. Die Einstellungen für den ABI 7500 Fast Thermocycler erfolgten gemäß dem in Tabelle 3.14 angegeben Protokoll.



Tab.: 3.14 Solis BioDyne® Einzelplatten ThermoCycler Einstellungen:

- 
- › ABI 7500 Software und ABI 7500 FAST cyclers starten
  - › „Advanced setup“ auswählen
  - » Klick „Experiment Properties“:
    - › Experiment benennen
    - › Instrument auswählen (7500 FAST; 96 wells)
    - › Experiment-Typ auswählen (Quantitation-Comparative Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ))
    - › Reagentien auswählen (SYBR Green Reagents)
    - › „Ramp Speed“ auswählen (~ 2 Stunden zur Fertigstellung)
  - » Klick „Plate Setup“:
    - › „Assign Targets and Samples“ auswählen
    - › Die gesamte Platte auswählen, Target entsprechend dem Plattenlayout beschriften
    - › Kontrollieren ob alle wells mit „U“ markiert sind
    - › Als „Sample“ das zu testende Gen eintragen
  - » Klick „Run Method“:
    - › Folgendes Protokoll einstellen:
 

› Initiale Aktivierung („holding stage“)	95 °C	12 Min
› „cycling stage“		
› Denaturierung	95 °C	15 Sek
› Hybridisierung	60 °C	30 Sek
› Elongation	72 °C	20 Sek
› „melting curve“		
› „Step 1“	95 °C	15 Sek
› „Step 2“	60 °C	1 Min
› „Step 3“	95 °C	30 Sek
› „Step 4“	60 °C	15 Sek
    - › Kontrollieren ob die „data capturing“ Icons aktiviert sind bei:
      - iii. „cycling Stage“: 60°C (30 Sekunden Schritt)
      - iv. „melting curve stage“: während der Rampenphase von 60°C bis 95°C
    - › „reaction volume“ auf 15 µl einstellen
    - › „number of cycles“ auf 40 einstellen
  - » Klick „Start Run“

### 3.7.2.2 Plattenauswertung

Um den Vergleich mit den RT<sup>2</sup> Profiler custom qPCR Platten zu ermöglichen, wurden die *threshold* Werte zur Erhebung der Ct-Werte aus den Solis BioDyne® Einzelplattenversuchen ebenfalls auf 0,03 gesetzt. Die so gewonnenen Ct-Werte entsprachen demnach der Amplifikat spezifischen Anzahl von PCR-Zyklen, die notwendig waren, um die Fluoreszenzstärke über das Hintergrundrauschen, den *threshold* von 0,03 zu erheben.

Die so gewonnenen Daten (Ct-Werte) lassen auf den ersten Blick nur einen groben Rückschluss auf die eingesetzte Menge an Proben - cDNA zu. Da die Ct-Werte invers proportional zu der eingesetzten Menge an Proben - cDNA sind, deuten hierbei Ct-Werte von < 29 auf eine große Menge an eingesetzter Proben - cDNA, Ct-Werte von 30 - 37 auf eine mäßige Menge an eingesetzter Proben - cDNA und Ct-Werte von 38 - 40 auf eine minimale Menge an eingesetzter Proben - cDNA oder eine Kontamination hin. Die absoluten Mengen an eingesetzter Proben - cDNA lassen sich auf diese Weise nicht bestimmen.

Zur Verbesserung der Aussagekraft mussten diese einfachen Ct-Werte weiter prozessiert werden. Zunächst wurden dazu der Mittelwert (MW) der beiden technischen Replikate (tR) der Ct-Werte jedes einzelnen Genes (MRC1, Chi3L1, FcyR2b und IGF-1), des Haushaltsgenes (GAPDH) sowie der Medium-Kontrolle (KO) für jede Stimulationssubstanz und jede Stimulationsdauer gebildet.

Um normalisierte Werte zu erhalten, wurden die  $\Delta$ Ct-Werte bestimmt.  $\Delta$ Ct-Werte beschreiben dabei den relativen Unterschied in der Expression eines Zielgenes zum Kontrollgen bei gleicher Stimulationsdauer mit derselben Stimulationssubstanz. Zu ihrer Berechnung wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta Ct = 2^{(Ct-MW\_GAPDH - Ct-MW\_Proben\ Gen)}$$

Auch die  $\Delta$ Ct-Werte geben die veränderte Gen Expression nur in Form einer abstrakten rationalen Zahl wieder. Dadurch lassen sich auch hier auf den ersten Blick nur bedingt Rückschlüsse auf die veränderte Genexpression durch die Stimulation mit einer bestimmten Substanz ziehen. Durch Berechnung des  $\Delta\Delta$ Ct-Wertes, d.h. der Veränderung des  $\Delta$ CT-Wertes eines Proben Gens ( $\Delta$ CT\_*Sample* Gen) um ein Vielfaches bezogen auf den normalisierten

Ct-Wert einer Kontrolle bei derselben Stimulationsdauer ( $\Delta\text{CT}_{\text{KO}}$ ), ließen sich weniger abstrakte ganze Zahlenwerte bestimmen. Zu ihrer Berechnung wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Sample Gen}} / \Delta\text{Ct}_{\text{KO}}$$

Die berechneten Werte ließen sich in logarithmischer Darstellung abbilden (Livak *et al.* 2001; Holzapfel *et al.* 2007; Fisher Thermo Scientific 2010).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Selektion potenzieller Markermoleküle

Zum Durchführungszeitpunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche basierten viele Erkenntnisse über die alternative Aktivierung von Mikrogliazellen auf Experimenten, die an murinen oder humanen Zellkulturen durchgeführt wurden. Darüber hinaus herrschte in der Literatur kein Konsens über die zur Identifizierung von alternativ aktivierten Mikrogliazellen zu verwendenden Markermoleküle.

Um ein auf die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimente angepasstes und um ein verlässliches Set an Markermolekülen zu identifizieren, wurden in einem ersten Schritt potenzielle Markermoleküle, bzw. die korrelierenden Markergene für die klassische und die alternative Aktivierung der Mikroglia selektioniert.

Die Auswahl der verwendeten potenziellen Markergene erfolgte durch die Analyse der auf den Datenbanken NCBI und Google Scholar zu Verfügung stehenden aktuellen Primärliteratur. Dabei war u.a. Bedingung, dass die potenziellen Markermoleküle bereits in mehreren Arbeiten im Zusammenhang mit der Identifizierung von bestimmten Aktivitätszuständen der Mikrogliazellen oder der Makrophagen beschrieben worden waren. Die Art der Stimulation konnte dabei entweder als anti- oder als pro-inflammatorisch klassifiziert sein. Des Weiteren wurden präferenziell diejenigen Markergene ausgewählt, die in Zellen nachgewiesen wurden, welche mit den klassischen Substanzen LPS oder IL-4 stimuliert waren. Zudem sollten die Zusammenhänge in den klassischen Tiermodellen Ratte oder Maus bzw. beim Menschen nachgewiesen worden sein. Die auf diese Weise ausgewählten Moleküle wurden entsprechend ihrer vermuteten Zugehörigkeit entweder in die Gruppe der potenziell pro-inflammatorischen Markergene oder in die Gruppe der potenziell anti-inflammatorischen Markergene eingeteilt (siehe Abschnitt: Material, Tabelle 3.8 und 3.9).

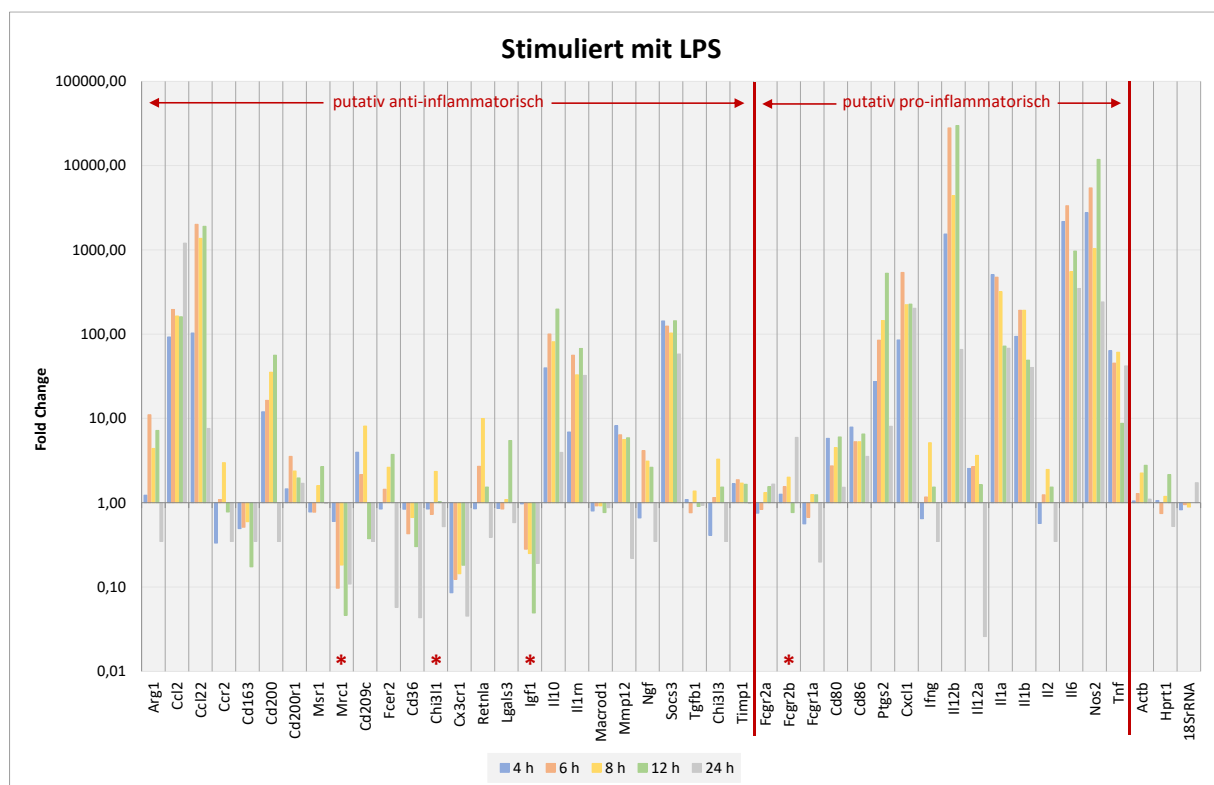
### 4.2 RT<sup>2</sup> Custom qPCR Expressionsassay

Nach der Selektion von putativen Markergenen sollte deren Expressionsverhalten in Mikrogliazellen untersucht werden. Zur Bestimmung der Expressionsstärke kamen hierbei RT<sup>2</sup> Custom qPCR Profiler 96-Well Platten™ zum Einsatz. Um eine mögliche

pro-inflammatorische Reaktion der primären Mikrogliazellen zu simulieren, wurden die Zellen mit bakteriellem LPS stimuliert. Dem entgegengesetzt wurden die Mikrogliazellen mit IL-4 stimuliert, um eine vermeintliche anti-inflammatorische Umgebungssituation zu simulieren. In beiden Fällen wurden die primären Ratten Mikrogliazellen den Stimulationsmedien für jeweils 4, 6, 8, 12 bzw. 24 Stunden ausgesetzt.

#### 4.2.1 Stimulation mit LPS

Die Stimulation der primären Mikrogliazellen mit bakteriellem LPS ergab das in Abb. 4.1 dargestellte Expressionsmuster.



**Abbildung 4.1: LPS induzierte mRNA Expression putativer pro- und anti-inflammatorischer Markergene:** Nach der Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) für 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden weisen die vermeintlich anti- und pro-inflammatorischen Markergene ein bestimmtes Expressionsmuster auf. Dargestellt ist die Über- oder Unter-Expression (Fold Change) der vermeintlichen Markergene (untere Auflistung) vom Grundwert (1,00). Die Markergene sind in die vermeintlich anti-inflammatorischen (links) und in die vermeintlich pro-inflammatorischen Markergene unterteilt. Die für weitere Versuche ausgewählten Markergene sind markiert (\*). Ganz rechts befinden sich die Haushaltsgene Act- $\beta$  (Actin Beta), HPRT 1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) und 18S rRNA. (n = 3).

#### 4.2.1.1 Expression putativ anti-inflammatorischer Markermoleküle

Innerhalb des Sets der potenziellen anti-inflammatorischen Markermoleküle zeigte sich, über alle Stimulationszeiträume gemittelt, eine Steigerung der Expression um das 100 bis 1000-Fache für CCL2 und CCL22. Die Expression der potenziellen Markermoleküle CD200, IL-10, IL-1 $\alpha$  und SOCS3 war um das 10 bis 100-Fache erhöht. Eine Zunahme der Expression um maximal das 10-Fache war bei den potenziellen Markermolekülen Arg1, CD200R, CD209, Fc $\epsilon$ R2, Retnla, MMP12, NGF sowie bei TIMP1 zuerkennen.

Die Expression der potenziellen Markermoleküle CCR 2, CD163, CD36 und IGF-1 bzw. MRC1, CX3CR1 war reduziert. Die erstgenannten waren dabei in ihrer Expression im Mittel um das 1- bis 6-Fache, die letztgenannten um das 10- bis 12-Fache erniedrigt.

Das Expressionsverhalten von MSR1, Chi3L1, Lgals3, MACROD2, TGF- $\beta$  und Chi3L3 unterschied sich nicht von dem der Haushaltsgene Act- $\beta$ , HPRT1 bzw. 18S rRNA.

Im zeitlichen Verlauf der Stimulation von 4 bis 24 Stunden nahm die Expression von Arg1, CCL 2, CCL 22, CD200, IL1 $\alpha$  und IL-10 im Mittel kontinuierlich zu. Demgegenüber nahm die Expression der Markermoleküle CD163, CD200R, CD36, Retnla, IGF-1 und SOCS3 im zeitlichen Verlauf ab. Die übrigen 14 vermeintlichen anti-inflammatorischen Markermoleküle wiesen kein eindeutig zeitabhängiges Expressionsverhalten auf. Bemerkenswert war, dass die Expression der vermeintlichen Markermoleküle Arg1, CCL22, CD200, Fc $\epsilon$ R2, IL-10, MMP12 und NGF nach 24 Stunden Stimulation im Verhältnis zu der Expression nach 2, 4, 8 oder 12 Stunden deutlich herabgesetzt war. In Relation zu den Haushaltsgenen war die Expression von Arg1, CD200, Fc $\epsilon$ R2, MMP12 und NGF sogar reduziert.

#### 4.2.1.2 Expression putativ pro-inflammatorischer Markermoleküle

Die Expression der vermeintlich pro-inflammatorischen Gene wurde durch die Stimulation mit LPS erwartungsgemäß deutlich stärker angehoben als die der vermeintlich anti-inflammatorischen Gene. Im Mittel war die Expression der vermeintlichen Markergene IL-12b, IL-6 und NOS2 um das 1000- bis über das 10.000-Fache erhöht. Die Markergene Ptgs2, CxCl1, IL 1a, IL 1b und TNF- $\alpha$  wiesen eine Zunahme der Expression um das 10- bis 1000-Fache auf. Eine Zunahme der Expression auf das maximal 10-Fache ließ sich bei CD80, CD86 sowie bei IL 12a feststellen.

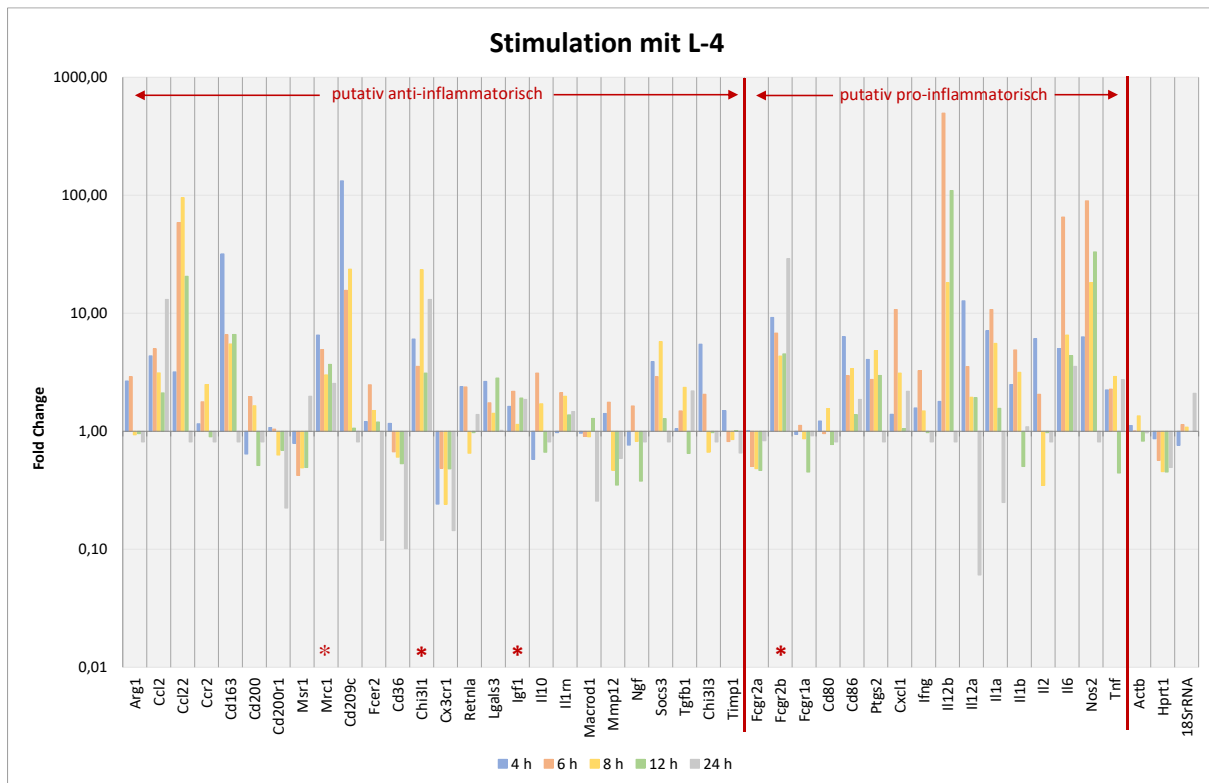
Ähnlich wie es bei den potenziell anti-inflammatorischen Markergenen zu beobachten war, ließ sich das Expressionsverhalten von FcγR2a, FcγR2b, IFNγ und IL-2 nach der Stimulation mit LPS nicht von dem der Haushaltsgene Act-β, HPRT1 bzw. 18S rRNA unterscheiden. Die Expression von FcγR1a war minimal reduziert.

Im zeitlichen Stimulationsverlauf wiesen Ptgs2, CxCl1, IL-12 und NOS2 eine leichte Zunahme der Expression auf. Bei IL-12α, IL-1α, IL-1β und IL-6 kam es zu einer Abnahme der Expression.

Die Expression von FcγR1a, Ptgs2, IL12b, IL12a und NOS2 war, ähnlich der der oben genannten vermeintlich anti-inflammatorischen Markermoleküle, nach 24 - stündiger Stimulation mit LPS herabgesetzt. Damit wichen auch diese Werte vom sonstigen zeitlichen Verlauf der Expression dieser Markermoleküle ab.

#### 4.2.2 Stimulation mit IL-4

Die Stimulation der primären Mikrogliazellen mit IL-4 ergab folgendes, in Abb. 4.2 dargestelltes Expressionsmuster.



**Abbildung 4.2: IL-4 induzierte mRNA Expression putativer pro- und anti-inflammatorischer Markergene:** Nach der Stimulation mit IL-4 (Interleukin 4) für 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden weisen die vermeintlich anti- und pro-inflammatorischen Markergene ein bestimmtes Expressionsmuster auf. Dargestellt ist die Über- oder Unter-Expression (Fold Change) der vermeintlichen Markergene (untere Auflistung) vom Grundwert (1,00). Die Markergene sind in die vermeintlich anti-inflammatorischen (links) und in die vermeintlich pro-inflammatorischen Markergene unterteilt. Die für weitere Versuche ausgewählten Markergene sind markiert (\*). Ganz rechts befinden sich die Haushaltsgene Act- $\beta$  (Actin Beta), HPRT 1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) und 18S rRNA. (n = 3).

##### 4.2.2.1 Expression putativ anti-inflammatorischer Markermoleküle

Über alle Stimulationszeiträume gemittelt zeigte sich für die Auswahl an potenziellen anti-inflammatorischen Markermoleküle ein weniger eindeutiges Bild als für die mit LPS stimulierten Zellen. Eine imposante Steigerung der Expression um das 100- bis 1000-Fache, wie sie für die Stimulation mit LPS gezeigt werden konnte, ließ sich nicht darstellen. Die vermeintlichen Markermoleküle CCL22, CD209 und Chi3L1 wiesen dennoch eine Steigerung der Expression um das 10- bis 100-Fache auf, wobei für einzelne Stimulationszeiten sogar eine



180- bis 280-Fache Expression gemessen wurde. Die meisten potenziellen anti-inflammatorischen Markermoleküle wiesen eine um das maximal 10-Fache gesteigerte Expression auf. Dazu gehörten Arg1, CCL2, CD163, MRC1, FcεR2, Retnla, Lgals3, IGF-1, IL-10, IL1rn, SOCS3, TGF-β und Chi3L3.

Die Expression der potenziellen Markermoleküle CD200R, CD36 und CX3CR1 war um das 1- bis 5-Fache erniedrigt. Das Expressionsverhalten von CCR2, CD200, MSR1, MACROD2, NGF, TIMP und MMP12 wies keine Veränderung von dem der Haushaltsgene auf.

Im zeitlichen Verlauf nahm lediglich die Expression von CCL22 im Mittel zu. Die Expression der Markermoleküle CD163, CD36, FcεR2 und Chi3L3 nahm demgegenüber im zeitlichen Verlauf ab. Alle anderen vermeintlichen anti-inflammatorischen Markermoleküle wiesen kein eindeutig zeitabhängiges Expressionsverhalten auf. Ähnlich wie nach Stimulation mit LPS beobachtet fiel auf, dass die Expression der vermeintlichen Markermoleküle CCL2, CD163, CD200R, CD209 sowie FcεR2 nach 24 Stunden Stimulation im Verhältnis zu der Stimulation nach 2, 4, 8 oder 12 Stunden deutlich herabgesetzt war. Dabei war die Expression von CD200R und FcεR2 in Relation zu den Haushaltsgenen auch in diesem Fall reduziert. Die Expression von MSR1 nach 24 Stunden Stimulation war, abweichend von den reduzierten Werten nach 2, 4, 8 und 12 Stunden, leicht erhöht.

#### 4.2.2.2 Expression putativer pro-inflammatorischer Markermoleküle

Die Expression der vermeintlich pro-inflammatorischen Gene wurde durch die Stimulation mit IL-4 nur schwach verändert. So wiesen lediglich die Markermoleküle IL12b, IL-6 und NOS2 eine konstant 10- bis 100-fach gesteigerte Expression auf. IL12b wies nach einer Stimulationszeit von 6 bzw. 12 Stunden sogar eine um das ca. 500-Fache bzw. um das 110-Fache erhöhte Expression auf. Viele der potenziellen Markermoleküle wie z.B. FcγR2b, CD86, Ptgs2, CxCl2, IFNγ, IL-12α, IL1b, IL-1α und TNF-α wiesen dem gegenüber im Mittel eine maximal um das 10-Fache erhöhte Expression auf.

Das Expressionsverhalten von FcγR2a, FcγR1a, CD80 und IL-2 unterschied sich nach der Stimulation mit IL-4 nicht von dem der Haushaltsgene. Im zeitlichen Verlauf nahm die Expression von IL12b und NOS2 leicht zu, während es bei FcγR2b und IL12a zu einer Abnahme der Expressionsstärke kam.

Nach 24 - stündiger Stimulation mit IL-4 nahm die Expression, abweichend von den übrigen Werten der Stimulationskohorte, von FcγR2b zu bzw. von Ptgs2, IL12b, IL12a, IL1a, IL1b und NOS2 ab.

### 4.3 qPCR Einzelversuche

Auf der Basis des beobachteten Expressionsverhaltens der putativen Markergene im Verlauf der RT<sup>2</sup> Custom qPCR Profiler Assays™ wurden vier Gene für die weitere Untersuchung ausgesucht. Diese ausgewählten Gene waren MRC1, Chi3L1, IGF-1 und FcγR2b.

MRC1 wurde u.a. deshalb ausgewählt, weil seine Expression nach der Stimulation mit LPS im Mittel um das 17-Fache reduziert, nach der Stimulation mit IL-4 aber um das bis zu 5-Fache gesteigert war. Die Expression wies darüber hinaus ein zeitabhängiges Verhalten auf. Die anderen ausgewählten Markergene Chi3L1, IGF-1 und FcγR2b qualifizierten sich durch das Auftreten ähnlicher Muster. So ließ sich durch die Stimulation mit IL-4 ebenfalls eine Expressionssteigerung um das maximal 16-Fache für Chi3L1 bei gleichzeitiger Reduktion der Expression durch LPS Stimulation um bis zu dem 4-Fachen beobachten. Dem gegenüber wurden die vermeintlich anti- bzw. pro-inflammatorischen Markermoleküle IGF-1 und FcγR2b ausgewählt, da sie ein völlig unerwartetes Verhalten zeigten. So führte die Stimulation mit IL-4 lediglich zu einer sehr geringen Expressionssteigerung auf das maximal 1,5-Fache des Ausgangswertes für IGF-1, wohingegen die Expression von FcγR2b maximal um das 12-Fache gesteigert wurde. Nach Stimulation mit LPS verhielt sich die Expression der beiden Markermoleküle abweichend zu den beobachteten Expressionsmustern nach Stimulation mit IL-4. So wurde die Expression von IGF-1 im Durchschnitt um das 14-Fache reduziert (maximal um bis zu das 42-Fache), wohingegen die Expression von FcγR2b im Durchschnitt nur um das 1-Fache gesteigert wurde (maximal um das 4-Fache).

In Einzelplatten-qPCR Versuchen sollte das Expressionsverhalten dieser Markermoleküle auf seine Reliabilität hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Gene mit den in Tabelle 2.2 (Abschnitt 2.5) aufgeführten Primern amplifiziert.

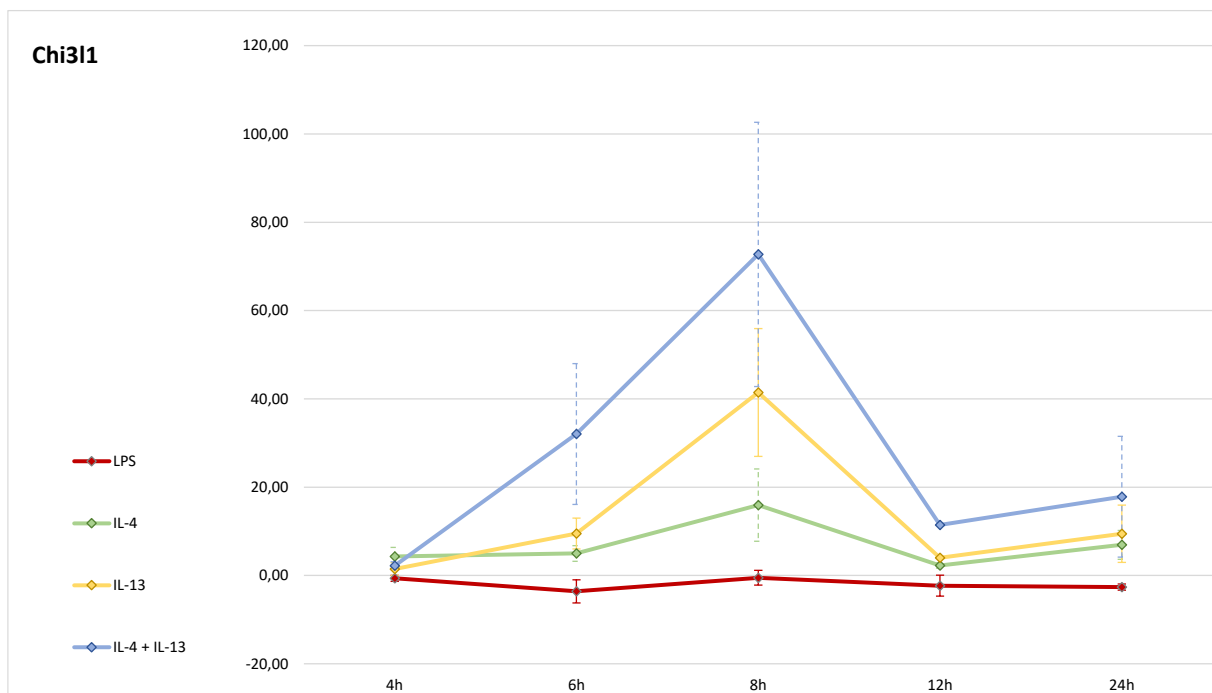
In einem ersten Schritt wurden die Mikrogliazellen für 4, 6, 8, 12 bzw. 24 Stunden mit LPS und IL-4 stimuliert. Um eine mögliche Verstärkung des Expressionsverhaltens zu erreichen, wurden die Zellen in Anbetracht des Rezeptoraufbaus und der gemeinsamen

Signaltransduktionskaskade von IL-4 bzw. IL-13 zudem mit IL-13 stimuliert und eine Ko-Stimulation mit IL-4 + IL-13 durchgeführt.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Stimulation von Mikrogliazellen in derselben Zeitabfolge mit LPS und IL-4; jeweils einzeln und als Ko-Stimulation mit TFF3. Ziel war die Überprüfung des Effekts von TFF3 auf die Expression der jeweiligen Markergene.

#### 4.3.1 Stimulation mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13

##### 4.3.1.1 Chi3L1



**Abbildung 4.3: Chi3L1 Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich anti-inflammatorischen Markergens Chi3L1 (*chitinase 3 like 1*) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression, wohingegen die Stimulation mit IL-4 zu einer Zunahme der Expression um den Faktor 6,5 führt. Durch die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 lässt sich die Expression von Chi3L1 um den Faktor 12,5 bzw. 28 steigern. (MW  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ).

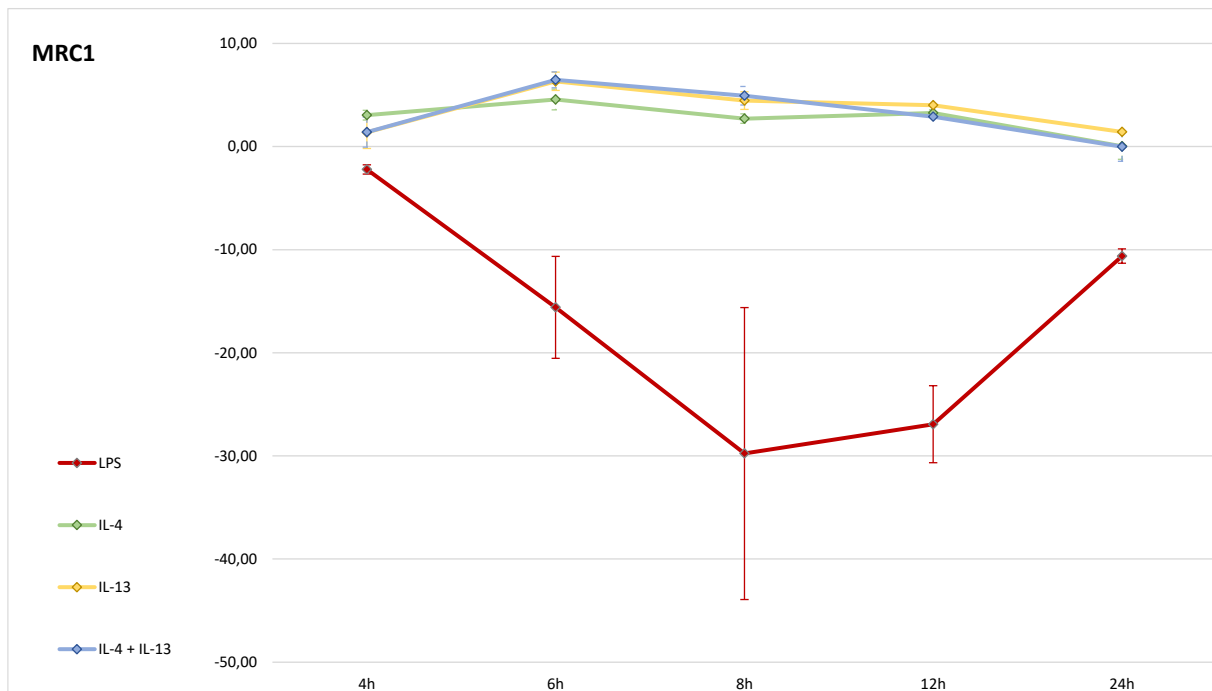
Nach der Stimulation mit IL-4 ließ sich eine Zunahme der Chi3L1 Expression um durchschnittlich das 6,5-Fache feststellen. Im Verlauf der Stimulation von 4 bis 8 Stunden stieg dabei die Expression kontinuierlich an. Sie erreichte nach 8 Stunden ihr Maximum bei einem

mittleren Wert, der dem 16-Fachen der Kontrollexpression entsprach. Nach 12 bzw. 24 Stunden nahm die Expression wieder ab. Dabei fiel die Expression nach 12 Stunden auf das Niveau der doppelten Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrolle ab, um nach 24 Stunden wieder auf das 7-Fache der Expression anzusteigen.

Nach Stimulation mit LPS nahm die Expression von Chi3L1 im Mittel um das 2-Fache ab. Durch die Stimulation mit IL-13 konnte eine weitere Steigerung der Expression im Verhältnis zur Stimulation mit IL-4 erreicht werden. Die Expression nahm dabei, im Verhältnis zur Kontrollexpression, im Mittel um den Faktor 12,5 zu. Ähnlich wie es bei der Stimulation mit IL-4 zu beobachten war, nahm auch nach der Stimulation mit IL-13 die Expression von Chi3L1 nach Erreichen ihres Maximums nach 8 Stunden (41-fache Expression) ab. Nach 12 Stunden erreichte sie ihren Tiefpunkt (4-fache Expression) um nach 24 Stunden erneut anzusteigen (9,5-fache Expression).

Durch die Ko-Stimulation der Mikrogliazellen mit IL-4 und IL-13 ließ sich die Expression von Chi3L1 im Vergleich zu der einfachen Stimulation mit IL-4 bzw. IL-13 weiter steigern. So stieg die Expression nach Ko-Stimulation über alle Zeiträume gemittelt um das 28-Fache (Mittel- IL-4: 6,5-fach, Mittel- IL-13: 12,5-fach). Dabei zeigte sich eine ähnliche Kinetik wie bei der Einzelstimulation mit IL-4 bzw. IL-13. Die Expression stieg bis zur 8 - stündigen Stimulation auf das maximal bis zu 72-Fache des Kontrollwertes an um nach 12 Stunden auf das 11,5-Fache zu fallen. Nach 24 - stündiger Stimulation stieg die Expression in Relation zur Kontrolle wieder um den Faktor 17,8 an.

## 4.3.1.2 MRC1



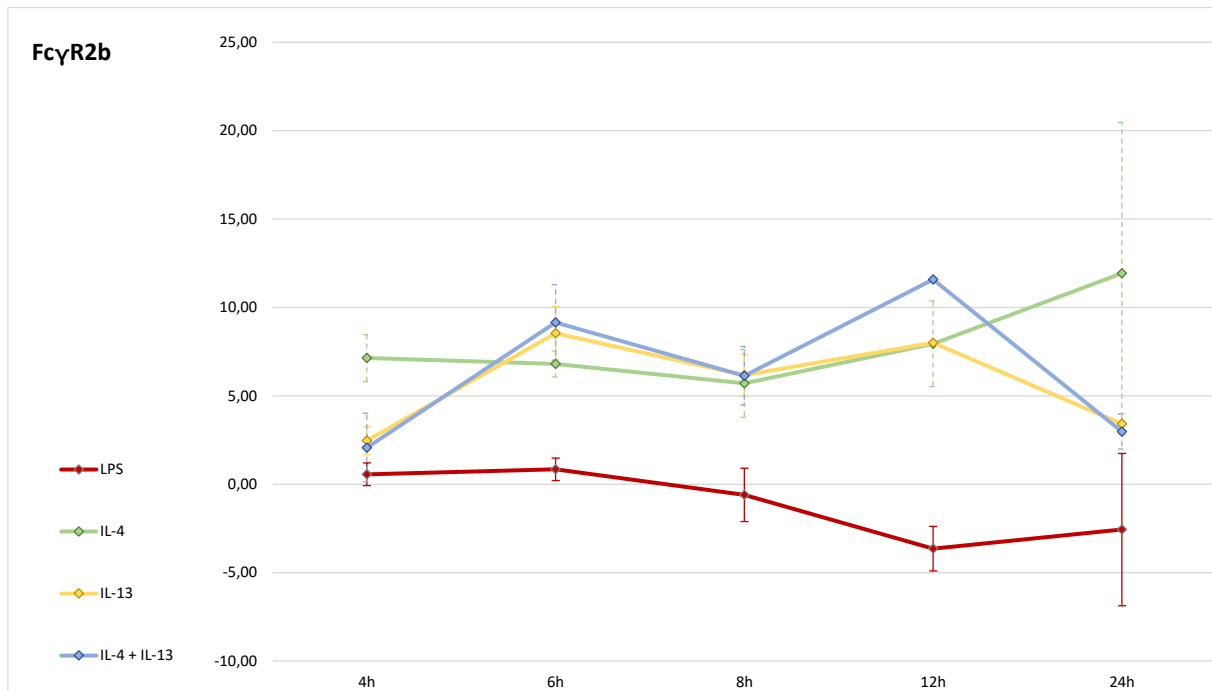
**Abbildung 4.4: MRC1 Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich anti-inflammatorischen Markergens MRC1 (mannose receptor c-type 1) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Expression, wobei der Tiefpunkt nach 8h erreicht wird. Durch Stimulation mit IL-4 lässt sich eine Zunahme der Expression um den Faktor 3 beobachten. Die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 lässt die Expression von MRC1 geringfügig ansteigen. Im zeitlichen Verlauf nimmt sie wieder ab. (MW  $\pm$  SEM, n = 6).

Die Expression von MRC1 wurde durch die Stimulation der Mikrogliazellen mit LPS im Mittel um den Faktor 17 reduziert. Die Expressionsstärke sank im Verlauf der Stimulation von 4 bis 8 Stunden auf einen Tiefstwert einer annähernd 30-fach reduzierten Expression. Nach 24 - stündiger Stimulation stieg die Expression wieder leicht auf eine 10,5-fach reduzierte Expression an.

Nach der Stimulation mit IL-4 wiesen die Mikrogliazellen eine 3-fach gesteigerte Expression des Markermoleküls MRC1 auf, wobei die Expression im Verlauf von 4 bis 24 Stunden kontinuierlich ab nahm. In Relation zu den Ausgangswerten nach 4 - stündiger Stimulation mit IL-4 erreichte die Expression nach 24 Stunden das Minimum mit einer im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Expressionsstärke. Durch die Stimulation der Mikrogliazellen mit IL-13 ließ sich lediglich eine Steigerung der Expression von MRC1 um das 4-Fache beobachten. Die Ko-Stimulation wies demgegenüber keine Änderung der

Expressionsstärke auf. Die nach der Stimulation mit IL-4 beschriebene zeitabhängige Expression von MRC1 ließ sich sowohl nach der Stimulation mit IL-13 als auch nach der Ko-Stimulation mit IL-4 + IL-13 beobachten.

#### 4.3.1.3 FcγR2b



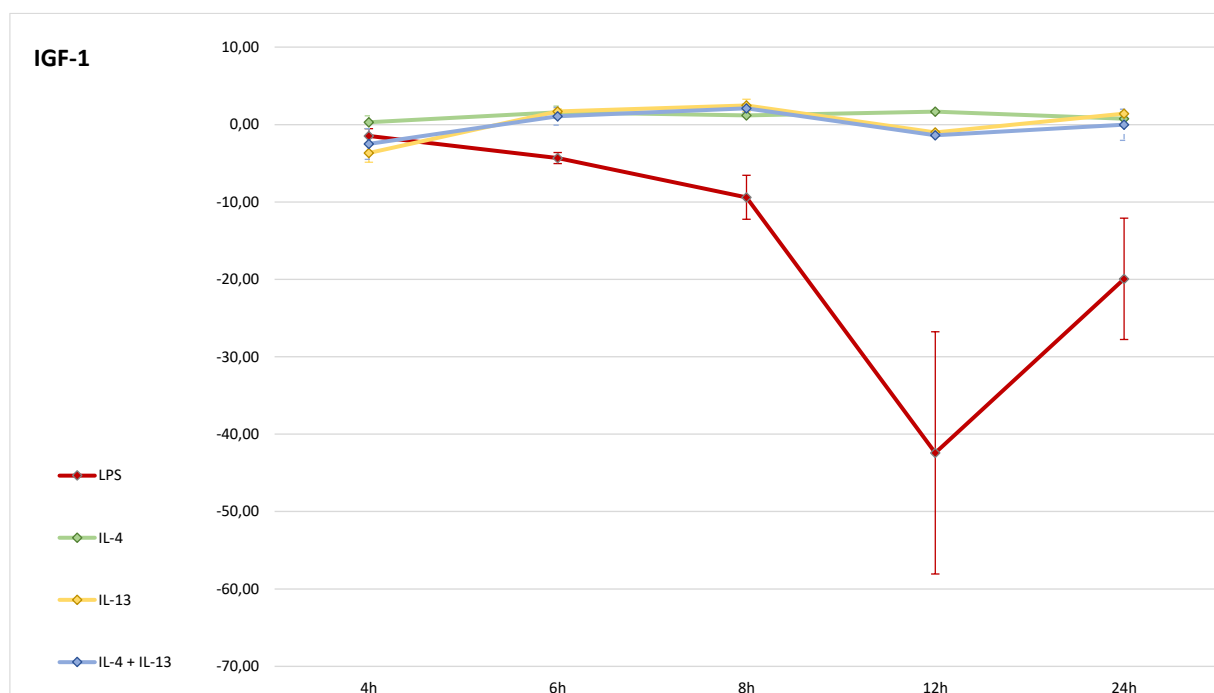
**Abbildung 4.5: FcγR2b Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich pro-inflammatorischen Markergens FcγR2b (Fc fragment of IgG receptor IIb) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zur Abnahme der Expression im zeitlichen Verlauf, wohingegen die Stimulation mit IL-4 zu einer Zunahme der Expression um maximal Faktor 12 führt. Durch die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 lässt sich die Expression von FcγR2b nach 6 und 12 Stunden geringfügig steigern (Faktor 9 bzw. 11,5). (MW  $\pm$  SEM, n = 6).

Im Verlauf der Stimulation mit LPS hielt sich die Expression von FcγR2b auf einem stabilen niedrigen Niveau zwischen einer identischen und verdoppelten Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrolle. Der Tiefstwert mit einer 3,5-fach reduzierten Expression wurde nach 12 Stunden erreicht.

Im Verhältnis zur Stimulation mit LPS steigerte sich die Expression von FcγR2b nach der Stimulation mit IL-4 im zeitlichen Verlauf auf das bis zu 12-Fache nach 24 Stunden. Sowohl durch die Stimulation mit IL-13, als auch durch die Ko-Stimulation mit IL-4 + IL-13 konnte keine bedeutsame Steigerung der Expression im Verhältnis zur Einzelstimulation mit

IL-4 nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Expression von FcγR2b in beiden Fällen zunächst anstieg und nach 6 bzw. 12 Stunden ihr Maximum erreichte (IL-13 Stimulation: 8,5-fach; IL-4 + IL-13 Stimulation: 11,5-fach) bevor sie wieder sukzessive auf das Niveau ihres Ausgangswertes abfiel (IL-13 Stimulation: 3,4-fach; IL-4 + IL-13 Stimulation: 3-fach). Dies stand im Gegensatz zur Expression von FcγR2b nach Stimulation mit IL-4, bei der nach 6 Stunden kein Peak zu beobachten war.

#### 4.3.1.4 IGF-1



**Abbildung 4.6: IGF-1 Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich anti-inflammatorischen Markergens IGF-1 (insulin *like* growth factor 1) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zur zeitabhängigen Abnahme der Expression. Die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-4 bzw. IL-4 + IL-13 bedingt keine eindeutige Zunahme der Expression. (MW  $\pm$  SEM, n = 6).

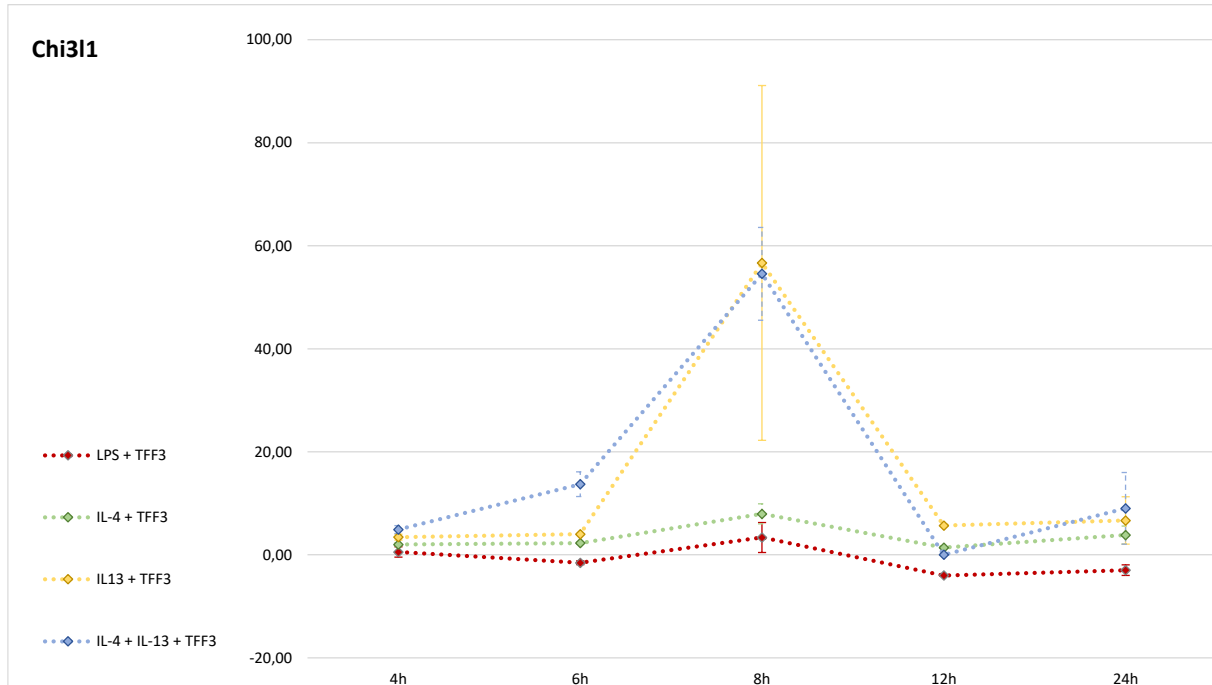
Das Markermolekül IGF-1 zeigte eine schwache Reaktion auf die Stimulation mit IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13. Im Vergleich zur Einzelstimulation mit IL-4 ließ sich im Mittel sowohl nach der Stimulation mit IL-13 als auch nach der Ko-Stimulation mit IL-4 + IL-13 einzig eine leichte Zunahme der Expression um den Faktor 1 feststellen. Ein zeitlicher Zusammenhang von Expressionsstärke und Stimulationsdauer war nicht zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte das Expressionsverhalten von IGF-1 nach der Stimulation mit LPS einen deutlich

zeitabhängigen Verlauf. Mit zunehmender Stimulationsdauer nahm die Expression von IGF-1 von Initial 1-fach reduzierter Expression nach 4 Stunden auf maximal eine 42-Fache Reduktion nach 12 Stunden ab. Nach 24 - stündiger Expression war die Expression im mittel weniger stark reduziert (Faktor -20).

#### 4.3.2 Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS bzw. IL-4 und TFF3

##### 4.3.2.1 Chi3L1

Ein Vergleich der Expressionsstärke von Chi3L1 nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS + TFF3 und derer nach Einzelstimulation mit LPS zeigte lediglich eine geringfügige Veränderung bzw. Verschiebung der Expressionsstärke. In beiden Fällen war eine Abnahme der Expressionsstärke über den Stimulationszeitraum zu beobachten, wobei die Expressionsniveaus nach Ko-Stimulation mit TFF3 für 8- bzw. 12 Stunden minimal deutlicher ausfielen (Faktor 3 vs. -0,5 bzw. Faktor -4 vs. -2,3).



**Abbildung 4.7: Expression von Chi3L1 nach Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des Markergens Chi3L1 nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-13 bzw. IL-4 mit TFF3 (trefoil factor 3) für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-13 bzw. IL-4 mit TFF3 lässt sich eine deutlichere Veränderung der Markergenexpression feststellen als nach der Einzelstimulation. (MW  $\pm$  SEM, n = 6).



Im Vergleich mit der einfachen Stimulation der Mikrogliazellen mit IL-4, bei der die Expression von Chi3L1 zeitabhängig auf eine maximal 16-fach erhöhte Expression nach 8 Stunden anstieg, zeigte sich bei der Ko-Stimulation von IL-4 mit TFF3 eine Halbierung der Expression um den Faktor 8 bei gleich bleibender Kinetik.

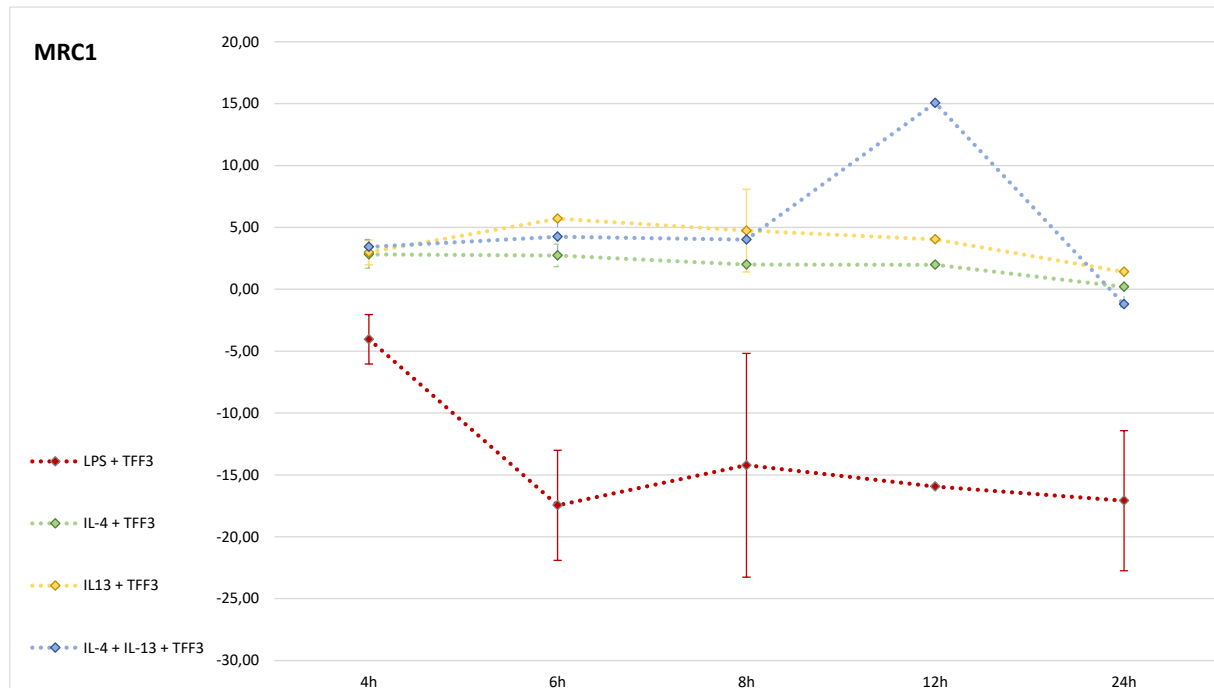
Ähnlich verhielt sich die Expression von Chi3L1 nach Ko-Stimulation mit IL-4, IL-13 und TFF3. Auch hier reduzierte sich die Expression nach 8 Stunden auf das 55-Fache respektiv zur Stimulation mit IL-4 und IL-13 und einer konsekutiven Expression von dem 73-Fachen im Verhältnis zur Kontrolle.

Lediglich durch Ko-Stimulation von IL-13 mit TFF3 ließ sich eine Steigerung der Expressionsrate im Vergleich zur einfachen Stimulation mit IL-13 (IL-13: 41,4-fach) auf das 56,5-Fache der Kontrollgruppe erreichen. Die Kinetik der Expression war in beiden Fällen vergleichbar konfiguriert.

#### 4.3.2.2 MRC1

Die Expression des Markermoleküls MRC1 verhielt sich nach Ko-Stimulation mit LPS und TFF3 auf ähnliche Art und Weise wie nach der Einzel-Stimulation mit LPS. In beiden Fällen nahm die Expression im Verlauf der Stimulation im Mittel ab, wobei die Reduktion derselben nach Ko-Stimulation schwächer ausfiel als nach Einzel-Stimulation (LPS Stimulation: Minimum -30-fach; LPS + TFF3 Stimulation: Minimum -17,5-fach). Im Gegensatz zur Einzelstimulation mit LPS zeigte sich nach der Kostimulation mit TFF3 kein eindeutig „muldenförmiges“ Expressionsverhalten - mit einem Minimum nach 8 Stunden und einer anschließenden Zunahme der Expression – sondern die Expression pendelte sich im Bereich eines 16-fach reduzierten Niveaus ein.

Nach Ko-Stimulation der Mikrogliazellen mit IL-4 bzw. IL13 mit jeweils TFF3 zeigten sich keine relevanten Veränderungen zur entsprechenden Einzel-Stimulation. Nach Kombination der Stimulantien IL-4 und IL-13 mit TFF3 ließ sich die Expression von MRC1 nach 12 - stündiger Stimulation auf das 15-Fache anheben, und damit deutlich über das Niveau der Versuche mit den entsprechenden Einzel-Stimulantien.

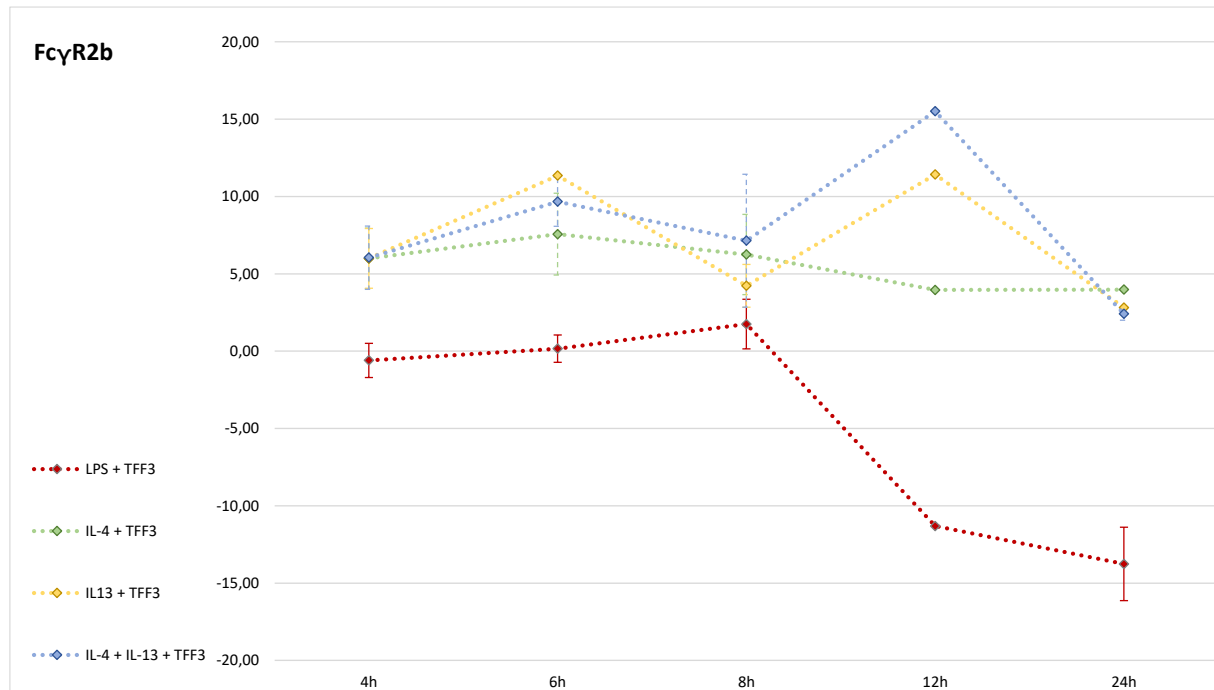


**Abbildung 4.8: Expression von MRC1 nach Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des Markergens MRC1 nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS bzw. IL-4 und TFF3 (trefoil factor 3) für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS und TFF3 für 6 Stunden zeigt sich eine deutlichere Reduktion des Expressionsniveaus als nach Einzel-Stimulation mit LPS. (MW  $\pm$  SEM, n = 6).

#### 4.3.2.3 FcγR2b

In Bezug auf FcγR2b zeigte sich eine sich zu den Vorbefunden konträr verhaltende Expression. So war nach Einzel-Stimulation mit LPS keine eindeutige Veränderung des Expressionsniveaus darstellbar. Durch die Kombination der Stimulantien LPS und TFF3 zeigte sich dem Gegenüber, nach 12 - bzw. 24 - stündiger Stimulation, eine deutliche Reduktion des Expressionsniveaus (LPS Stimulation: Minimum  $-3,5$ -fach bzw.  $-2,5$ -fach; LPS + TFF3 Stimulation: Minimum  $-11$ -fach bzw.  $-14$ -fach).

Die Stimulation der Zellen mit IL-4 und/oder IL-13 in Kombination mit TFF3 zeigte ein ähnlich zeitabhängiges Verhalten. Während innerhalb der ersten 8 Stunden nach Stimulation keine großen Veränderungen der Expressionsniveaus im Vergleich mit und ohne TFF3 festzustellen waren, so divergierten sie nach 12 - bzw. 24 - stündiger Stimulation deutlicher. Durch die Ko-Stimulation von IL-4 und TFF3 wurde die Expression z.B. lediglich um den Faktor 4 gesteigert wohingegen sie nach Stimulation mit IL-4 um das bis zu 12-Fache anstieg.



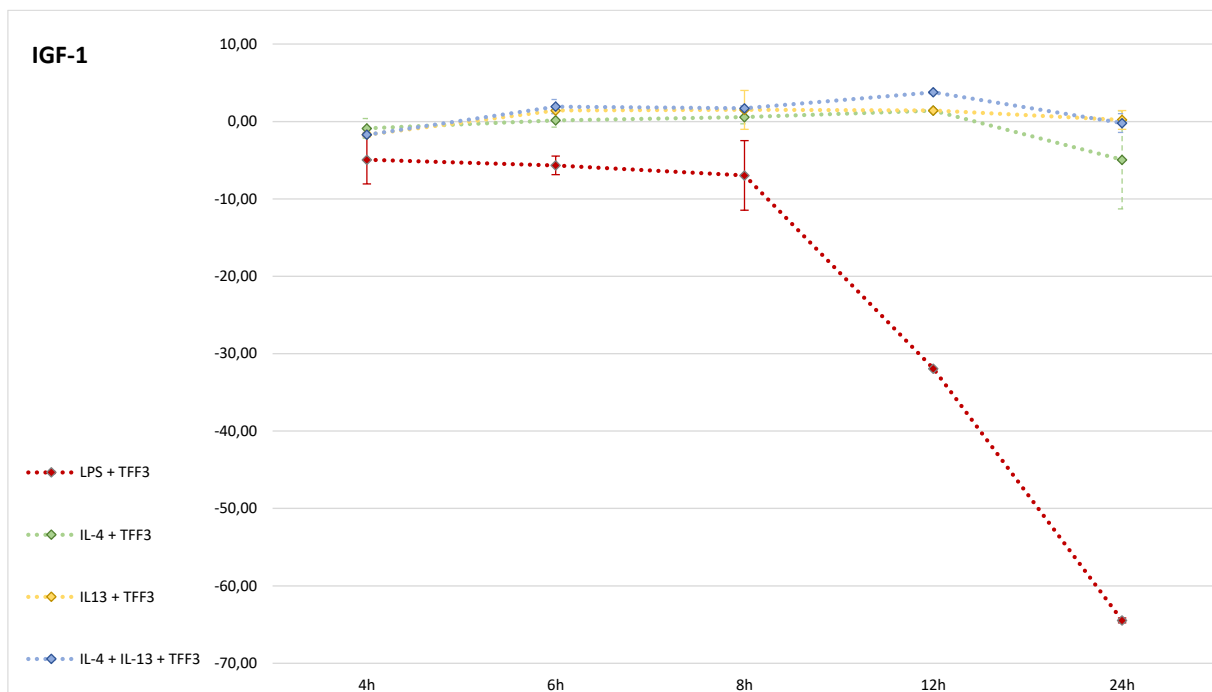
**Abbildung 4.9: Expression von FcγR2b nach Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des Markergens FcγR2b nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-13 bzw. IL-4 und TFF3 (trefoil factor 3) für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Durch die Kombination der Stimulantien LPS und TFF3 zeigte sich dem Gegenüber, nach 12 - bzw. 24 - stündiger Stimulation, eine deutliche Reduktion des Expressionsniveaus (LPS Stimulation: Minimum –3,5-fach bzw. –2,5-fach; LPS + TFF3 Stimulation: Minimum –11-fach bzw. –14-fach). (MW ± SEM, n = 6).

Die Stimulation mit IL-13 alleine oder zusammen mit TFF3 erbrachte keine eindeutige Änderung der Ergebnisse. Durch die Kombination von IL-4 und IL-13 mit und ohne TFF3 zeigte sich ein verändertes Expressionsverhalten. So führte die Ko-Stimulation mit TFF3 zu einer durchschnittlichen Steigerung der Expression von FcγR2b um den Faktor 2.

#### 4.3.2.4 IGF-1

Im Falle des Insulin *like* growth factor 1 (IGF-1) ließen sich weder durch die vermeintlich anti-inflammatorischen Stimulantien IL-4 und IL-13 bzw. deren Kombination miteinander oder mit TFF3 eine Veränderung des Expressionsniveaus auslösen.

Nach 12 - bzw. 24 - stündiger pro-inflammatorischer Stimulation mit LPS zeigte sich dem gegenüber eine deutliche Reduktion der Expression (ca. –42-fach bzw. ca. –20-fach). Durch die Kombination von LPS mit TFF3 ließ sich diese Reduktion, für eine Stimulationszeit von 24 Stunden, weiter auf ein minimales Niveau des -64-Fachen verstärken.



**Abbildung 4.10: Expression von IGF-1 nach Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des Markergens IGF-1 nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-13 bzw. IL-4 mit TFF3 (trefoil factor 3) für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach 12 - bzw. 24 - stündiger pro-inflammatorischer Stimulation mit LPS zeigte sich dem gegenüber eine deutliche Reduktion der Expression (ca. –42-fach bzw. ca. –11-fach). Durch die Kombination von LPS mit TFF3 ließ sich diese Reduktion, für eine Stimulationszeit von 24 Stunden, weiter auf ein minimales Niveau des -64-Fachen verstärken. (MW  $\pm$  SEM, n = 6).

## 5 Diskussion

### 5.1 Grundlagen

Die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn von Säugetieren ist eines der zentralen Elemente bei der Regulation von Entzündungsprozessen im ZNS (Graeber *et al.* 2011). Als Mediator von inflammatorischen Prozessen lässt sich den Mikrogliazellen hierbei eine Schlüsselrolle zuordnen (Salter *et al.* 2014). Sie treten in Form einer eigenständigen Subpopulation von Entzündungszellen im ZNS auf, die sich zu einem frühen Zeitpunkt der Ontogenese von der gemeinsamen Entwicklungslinie mit anderen Entzündungszellen, wie z.B. den Makrophagen der Peripherie, abgegliedert hat (D. R. Beers *et al.* 2006; Ginhoux *et al.* 2013). Ungeachtet dieser lediglich entfernten Verwandtschaft weisen Mikrogliazellen dennoch einige Gemeinsamkeiten mit ihren peripheren Verwandten auf. So sind beide dazu in der Lage, in Abhängigkeit von Mediatoren in ihrer Umgebung, verschiedene Morphologien einzunehmen und verschiedene funktionelle Stadien zu durchlaufen (Kettenmann *et al.* 2011). Innerhalb dieser Stadien der differenziellen Aktivität sind die Zellen in der Lage, die unterschiedlichsten immunologischen Aufgaben zu übernehmen. So treiben sie in ihrer klassischen Aktivitätsform (M1 bzw. M1-like) Entzündungsprozesse voran, während sie in ihrer alternativen Aktivitätsform (M2 bzw. M2-like) die Modulation, Eindämmung oder Beendigung von Entzündungsprozessen bewirken können (Mosser *et al.* 2008; Varin *et al.* 2009; Colton 2009; Sica *et al.* 2012; Cherry *et al.* 2014; Butovsky *et al.* 2014; Amici *et al.* 2017). Da eine fortwährende Entzündung einen fatalen Ausgang für die Integrität des ZNS und somit für den gesamten Organismus hätte, muss es eine Möglichkeit zur Verschiebung des Aktivitätszustandes, weg von der pro- und hin zur anti-inflammatorischen Aktivität, geben (Colton 2009; Kigerl *et al.* 2010). Die eindeutige Identifikation und damit verbunden die Möglichkeit der wissenschaftlichen Beschreibung der verschiedenen Aktivitätszustände, die Beeinflussung der Aktivitätszustände sowie die Möglichkeit der medizinischen Nutzbarmachung des entzündungsmodulierenden Charakters der Mikrogliazellen sind bis heute Gegenstand eines wissenschaftlichen Diskurses; sie sind auch das Leitmotiv dieser Dissertation.

## 5.2 Markermolekül Präselektion

Im Verlauf der Analyse der aktuellen Primärliteratur fällt auf, dass sich eine Vielzahl der Arbeiten zur differentiellen Aktivität mit Zellkulturen, Lebendpräparaten oder zyto-histologischen Präparaten peripherer Makrophagen, aber selten mit Mikrogliazellen befassen (Mosser *et al.* 2008). Darüber hinaus beschäftigen sich die verschiedenen Arbeiten mit unterschiedlichen Spezies, wie z.B. mit der Maus oder mit dem Menschen (Chauhan *et al.* 2017). Ungeachtet dessen finden zur Charakterisierung der unterschiedlichen Aktivitätszustände von Makrophagen und Mikrogliazellen in vielen dieser Arbeiten dieselben Markermoleküle Anwendung. Am Beispiel von Raes *et al.* wird deutlich, dass diese gängige Praxis nicht unproblematisch zu sein scheint. So lässt sich nachweisen, dass einige der am weitesten verbreiteten Markermoleküle der alternativen Aktivität, YM1 bzw. Arginase 1 (Arg1), sehr wohl bei Mäusen, nicht aber bei Ratten nachzuweisen sind bzw. dass sich deren Expression durch eine anti-inflammatorische Stimulation nicht steigern lässt (Raes *et al.* 2005). Die bekannten Markermoleküle lassen sich dem entsprechend nicht artübergreifend und/oder auch nicht in vereinfachender, vergleichender Weise bei der Charakterisierung der Aktivitätszustände von Makrophagen und Mikroglia verwenden. Vielmehr wäre eine differenziertere Herangehensweise in Betracht zu ziehen.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass es innerhalb des Unterstamms der Vertebrata artübergreifende und ungeachtet der ontogenetisch nur entfernten Verwandtschaft von Makrophagen und Mikroglia ein gewisses Maß an Gen-Konservierung geben muss. Diese ermöglicht einen Vergleich der Regulation des Aktivitätszustandes der Zellen. Ein Rückschluss auf eine allgemeine für verschiedene Zelltypen oder sogar Spezies gültige Systematik der für eine Aktivitätsform spezifischen Markermoleküle ist jedoch nicht möglich.

Um die Identifikation der verschiedenen Aktivitätszustände dennoch zu ermöglichen und damit eine Basis für weitergehende Experimente zu schaffen, sollte im Rahmen dieser Arbeit in einem ersten Schritt ein Set von potenziellen Markermolekülen für die in unserer Arbeitsgruppe verwendeten primären Ratten Mikrogliazellen identifiziert werden, mit deren Hilfe die eindeutige Zuordnung der Zellen in die Aktivitätszustände „klassisch“ und „alternativ“ möglich wäre.

Die Präselektion der 42 putativen Markergene erfolgte nach den im Kapitel 4.1 genannten Kriterien. Dadurch sollte die Aussicht auf ein positives Ergebnis der folgenden Versuche erhöht werden. Aufgrund der initial willkürlich gesetzten Selektionskriterien war jedoch keine eindeutige Prognose über den tatsächlichen Erfolg der Experimente möglich.

Retrospektiv hätte eine strengere Präselektion auf bei primären Ratten Mikroglia vorbeschriebenen Markermolekülen das Ergebnis der Arbeit womöglich verbessern können. Andererseits ermöglichte der gewählte ‚*unbiased*‘ (unvoreingenommene) Ansatz den Vergleich und die differenzierte Betrachtung der verbreiteten Praxis einer Art- und Zelllinien übergreifenden Anwendung von Markermolekülen.

### 5.3 ‚*unbiased*‘ Assay

Bei der Analyse der ‚*unbiased*‘ qRT2 Profiler Assays™ zeigte sich der Vorteil einer weiter gefassten Präselektion von potenziellen Markermolekülen. Nach „klassischer“ Aktivierung der Mikrogliazellen mit Lipopolysaccharid (LPS) kam es, wie erwartet, im Durchschnitt zu einer deutlichen Zunahme der Expression von vermeintlich pro-inflammatorischen Markermolekülen. Besonders die in unserer Arbeitsgruppe oft zur Anwendung kommenden Marker einer klassischen Aktivität von Mikrogliazellen IL-6, ROS (NOS 2) und IL-12 traten mit einer durchschnittlichen um den Faktor 5000 (maximal bis zu 10.000-fach) gesteigerten Expression hervor. Nach der Stimulation mit IL-4, der „alternativen“ Aktivierung, waren diese Markermoleküle ebenfalls stark überexprimiert, allerdings 100-Fach geringer als nach der Stimulation mit LPS. Gleichwohl überstiegen sie das Expressionsniveau der meisten putativ anti-inflammatorischen Markermoleküle bei weitem. Diese Markermoleküle können demnach eine allgemeine Aktivierung der Mikrogliazellen auf Umweltreize anzeigen und bei bestimmter, pathologischer Reizung einen *Shift* der Zellen hin zu einer pro-inflammatorischen M1 Konfiguration markieren.

Andere vermeintlich pro-inflammatorischen Markermoleküle wie *Ptgs2*, *CxCl1*, *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  oder *TNF- $\alpha$*  zeigten eine geringere, aber immer noch auffällige Steigerung ihrer Expression nach Stimulation mit LPS. Interessanterweise zeigten einige der in der Literatur als putativ anti-inflammatorisch vorbeschriebenen Marker (*CCL2*, *CCL22*, *CD200*, *IL-10*, *IL-1 $\gamma$*  und *SOCS3*) ein sehr ähnliches Verhalten auf die Stimulation mit LPS. Ihre Expression fiel allerdings

insgesamt schwächer aus als die der vermeintlich pro-inflammatorischen Markermoleküle. Nach der Stimulation mit IL-4 zeigten dieselben putativ pro- und anti-inflammatorischen Markermoleküle eine ähnliche Reaktionsweise. Das Expressionsniveau reduzierte sich zudem noch einmal deutlich. Als Ausnahme hiervon zeigte CCL22 eine deutliche zeitabhängige Expressionssteigerung; sowohl nach der Stimulation mit LPS als auch nach der Stimulation mit IL-4.

Aufgrund des gezeigten unspezifischen Expressionsverhaltens erwiesen sich die aufgezählten Markermoleküle insgesamt als ungeeignet für die eindeutige Charakterisierung von Aktivitätszuständen. Einzig CCL22 könnte aufgrund seiner zeitabhängigen Expressions-Kinetik zur weiteren Untersuchung der Veränderung von Aktivitätszuständen von Nutzen sein. Weiterführende Untersuchungen zur genaueren Beschreibung des Verhaltens von CCL22 erscheinen hierzu erforderlich.

Ähnliches gilt für die potenziell pro-inflammatorischen (CD80, CD86 und IL-12 $\alpha$ ) und die potenziell anti-inflammatorischen Markermoleküle (Arg1, CD200 r1, CD209, MMP12 und NGF). In allen Fällen war durch eine Stimulation mit LPS bzw. IL-4 keine eindeutige Veränderung des Expressionsverhaltens der Markermoleküle zu beobachten. Dieser Befund scheint demnach zu unterstreichen, dass die einfache Ableitung des Aktivitätszustandes einer Zelle aus der Expressionsstärke einzelner Moleküle mit einer vermeintlichen pro- bzw. anti-inflammatorischen Bestimmung nicht immer möglich ist. Denn unter gewissen Umständen erscheinen sowohl vermeintlich anti-inflammatorische Markermoleküle als auch putativ pro-inflammatorische Moleküle durch die Stimulation mit pro- oder anti-entzündlichen Agenzien in einem vergleichbaren Maß überexprimiert zu werden.

Ungeachtet der oben erwähnten Feststellung sind in diesem Setting auch vermeintlich anti-inflammatorische Markermoleküle hervorgetreten, die nach der Stimulation mit LPS eine Herabsetzung ihrer Expression erfuhren (Chi3L1, CCR 2, CD163, CD36 und IGF-1 bzw. MRC1 und CX3CR1). Die Stimulation mit IL-4 führte demgegenüber zu einer Steigerung der Expression einiger der Moleküle (CD163, MRC1, Chi3L1). In umgekehrter Art und Weise zeigte sich, dass die Stimulation mit LPS zu keiner nennenswerten Veränderung der Expression des aus der Familie der vermeintlich pro-inflammatorischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren stammenden Markermoleküls Fc $\gamma$ R2b führte, wohingegen die Stimulation mit IL-4 eine deutliche Expressionssteigerung auslöste.



In der Zusammenschau wird deutlich, dass die oft praktizierte Methodik einer singulären Betrachtung von Markermolekülen zur Einteilung einer inflammatorischen Zelle (z.B. Mikrogliazelle) in einen Aktivitätszustand nicht ausreicht und dass eine solche Methodik der Komplexität der zugrundeliegenden Mechanismen nicht gerecht wird. Vielmehr scheint die Betrachtung von Sets an Markermolekülen sowie deren differenzielles Expressionsmuster über die Zeit ausschlaggebend zu sein, um die dynamischen Aktivitätsmuster der Mikrogliazellen während eines entzündlichen Prozesses oder während einer *in vitro* durchgeführten Simulation zu charakterisieren. Diesem Gedanken folgend wurde aus dem ‚unbiased‘ Assay ein Set von vielversprechenden putativen Markermolekülen für die anti-inflammatorischen Aktivitätszustände ausgewählt (MRC1, Chi3L1, IGF-1 und FcγR2b).

Das ebenfalls vielversprechende Markermolekül CD163 ließ sich in den fortgesetzten Untersuchungen nicht adäquat amplifizieren und musste deshalb aus der weiteren Betrachtung herausgenommen werden. Eine erneute Amplifikation des Genes mit alternativen Primersequenzen und eine weiterführende Untersuchung könnte zur sinngemäßen Erweiterung dieses Studienaufbaus erwogen werden.

In Einzelversuchen wurde im Folgenden versucht, die beobachtete Dynamik der Expression auf Basis von qPCR Analysen zu verifizieren.

## 5.4 Einzelversuche

Dabei zeigten sich für die ausgewählten putativen Markermoleküle Chi3L1, MRC1, FcγR2b sowie IGF-1 jeweils typische und reproduzierbare Verhaltensmuster. Das Markermolekül Chi3L1, bekannt als YM1 aus Experimenten an menschlichen Zellen oder als Chi3L1 der Maus (YM-1 mouse homolog chitinase 3 like 1), erwies sich entgegen den Beobachtungen von Raes *et al.* als ein guter Kandidat zur Identifikation der alternativen Aktivität von primären Ratten Mikrogliazellen (Raes *et al.* 2005). Anfang der 2000-er Jahre konnten Colton und Hung nachweisen, dass Chi3L1 in Mikrogliazellen produziert wird und dass seine Expression durch die Stimulation mit IL-4 bzw. IL-13 in Mausmodellen gesteigert werden kann (Hung *et al.* 2002; Colton *et al.* 2006). Diese Ergebnisse für primäre Ratten Mikroglia konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich ebenfalls eine eindeutige Zunahme der Chi3L1-Expression durch die Stimulation mit IL-4- bzw. IL-13. Dem gegenüber ließ sich nach der Stimulation mit LPS keine eindeutige Veränderung der Expression darstellen,

wohingegen die Ko-Stimulation mit IL-4 und IL-13 zu einer weiteren Steigerung der Chi3L1 Expression führte.

Gleichwohl besteht weiterhin Unklarheit über die Rolle, die Chi3L1 in der alternativen Aktivität der Mikrogliazellen und damit im ZNS spielt. Bekannt ist, dass Chi3L1 zu einer großen Familie von Chitinasen gehört, die sowohl von Makrophagen in der Peripherie als auch von Mikrogliazellen im ZNS sezerniert werden. Es wird angenommen, dass Chi3L1 aufgrund des Fehlens eines eigenen aktiven enzymatischen Zentrums, aufgrund seiner Fähigkeit an Heparinsulfat zu binden und aufgrund der Fähigkeit zur Unterdrückung der IL-1- und TNF- $\alpha$ -abhängigen Signaltransduktion den Umsatz von Wachstumsfaktoren im Extrazellulärraum verlangsamen kann; durch Modulation der pro-inflammatorischen Zellantwort ist Chi3L1 eher an der Stabilisierung des Extrazellulärspaces (EZR) beteiligt (Rehli *et al.* 1997; Recklies *et al.* 2002; Raes *et al.* 2002; Ling *et al.* 2004). Die gesteigerte Expression von Chi3L1 nach der Ko-Stimulation mit IL-4 und IL-13 könnte zudem darauf hindeuten, dass ähnlich der Ko-Aktivierung von z.B. T-Zellen im Immunsystem höherer Wirbeltiere, für die adäquate Aktivierung der Transkription von Chi3L1 eine doppelte Stimulation der Rezeptoren notwendig ist, um eine adäquate Signaltransduktion über den JAK-STAT-Signalweges zu ermöglichen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wären weitere Untersuchungen nötig.

Die Expression von Fc $\gamma$ R2b (Fc fragment of Ig  $\gamma$  receptor IIb) stieg nach der Stimulation mit IL-4 im zeitlichen Verlauf kontinuierlich an. Die (Ko-)Stimulation mit IL-13 verstärkte diesen Effekt nicht. Eine Stimulation mit LPS führte demgegenüber zu keiner signifikanten Expressionssteigerung.

Fc $\gamma$ R2b stellt den häufigsten Vertreter aus der Gruppe von Fc $\gamma$ -Rezeptoren dar, die generell mit der Verknüpfung des angeborenen- und des adaptiven Immunsystems assoziiert sind (Chauhan *et al.* 2017; Li *et al.* 2019). Während die anderen Mitglieder dieser Rezeptor-Familie (z.B. Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ RIV) eher mit einer pro-inflammatorischen Funktion in Verbindung gebracht werden, führt Fc $\gamma$ R2b hingegen zu einer Reduktion der Rezeptor-assoziierten Aktivierung der Zellen (Heusser *et al.* 1977; Takai *et al.* 1994; Fukuyama *et al.* 2005; Nimmerjahn *et al.* 2008; Nimmerjahn 2016; Pricop *et al.* 2001). Damit besitzt Fc $\gamma$ R2b die Fähigkeit, den unkontrollierten Fortlauf einer Entzündung über autonome Prozesse oder über die Aktivierung anderer pro-inflammatorischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren auszugleichen und für eine Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Einflüssen zu sorgen

(Fukuyama *et al.* 2005; Nimmerjahn und Ravetch 2008).

Der Nachweis einer gesteigerten Expression von FcγR2b auf den Stimulus von IL-4 bei primären Ratten Mikrogliazellen bestätigt die Entdeckung von Chauhan *et al.* (2017). Diese konnten bereits an Mäusen nachweisen, dass FcγR2b und nicht die anderen Mitglieder der FcγR-Familie durch die Stimulation mit dem Cytokin IL-4 überexprimiert wird. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe durch *knock-out* Versuchen darstellen, dass der Verlust von FcγR2b zur Unfähigkeit der Zellen führte, einen Zustand der alternativen Aktivierung (M2-like) anzunehmen. Diese Erkenntnis lässt sich im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass es nach der Stimulation mit IL-4 zu einem zeitabhängigen Anstieg der Expression von FcγR2b kommt, als Hinweis auf eine Änderung des Aktivitätszustands der Mikrogliazellen verstehen. Somit ließe sich FcγR2b als ein Marker für einen *Shift* des Aktivitätszustandes heranziehen. Zudem kann die zeitabhängige Expressionssteigerung von FcγR2b ein Hinweis darauf sein, dass die stimulationsreizabhängige Freisetzung von Molekülen bereits zu einer Veränderung der Zellumgebung beigetragen hat. Diese kann wiederum eine Veränderung des zelleigenen Expressionsverhaltes und damit der intrinsischen Zellphysiologie zur Folge haben. Es kann also eine Art selbstlimitierender Faktor der pro-inflammatorischen Zellaktivität zugrunde liegen.

In Anlehnung daran kann diese beschriebene Eigenschaft ebenfalls zur Mikroglia-Aktivierung mit therapeutischem Ansatz herangezogen werden. So ist es denkbar, dass eine Überstimulation von FcγR2b zu einem *shift* des Aktivitätszustands von Mikrogliazellen beitragen kann. Die u.a. durch Fcγ-Rezeptoren mediierte Endozytose von Zellbestandteilen bzw. die Chemotaxis auf Regionen mit erhöhter Entzündungsaktivität kann durch den inhibitorischen Effekt von FcγR2b reduziert werden (Zheng *et al.* 2015). Dadurch kann unter Umständen Effekte auf den Ausgang einer entzündlichen Reaktion wie sie z.B. beim Morbus Parkinson und der damit assoziierten α-Synuklein Akkumulation besteht, abgemildert werden.

Die Expressivität der Markermoleküle MRC1 (Mannose Rezeptor C type 1) und IGF-1 (Insulin like-growth factor 1) blieb nach Stimulation mit IL-4, IL-13 oder einer Kombination beider auf einem stabil niedrigen Niveau. Dem gegenüber führte die Stimulation mit LPS zu einer deutlichen Abnahme der Expression im zeitlichen Verlauf. Die Ko-Stimulation mit TFF3 scheint den hemmenden Einfluss des LPS auf die Expression jedoch zu reduzieren, wie an der

Nivellierung des Expressionsniveaus nach 6 - stündiger Stimulationsdauer zu erkennen ist. Dabei ist die Rolle, die beide Moleküle im Rahmen einer neuronalen Inflammation spielen, noch nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch postuliert, dass das kohlenhydrat-bindende Lectin MRC1 u.a. eine Funktion bei der Phagozytose hat und durch die Steigerung der Expression von IL-10 und IL-1 $\beta$  Rezeptor Antagonist (IL-1R $\alpha$ ) Einfluss auf die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Zellen nimmt (Gazi und Martinez-Pomares 2009).

Über die Funktion des Insulin *like* growth factor 1 (IGF-1) im Verlauf von neuronalen Entzündungsprozessen wird ebenso ein Diskurs geführt. Es wird angenommen, dass IGF-1 über einen neuroprotektiven Effekt und über die Fähigkeit zur Beeinflussung des Aktivitätszustandes von Mikrogliazellen verfügt, indem es einen direkten *shift* von M1-*like* zu M2-*like* Mikrogliazellen bewirkt (Ueno *et al.* 2013; Lee *et al.* 2013). Darüber hinaus wird postuliert, dass in das ZNS eindringendes IGF-1 einen mitogenen Effekt auf Mikrogliazellen haben kann und auf diese Weise mit für die reaktive Mikroglie verantwortlich sein kann (O'Donnell *et al.* 2002). Der postulierte protektive Effekt des IGF-1 kann zudem von der Fähigkeit der Mikrogliazellen abhängen, auf IGF-1 mit einer M2-*like* Aktivitätsänderung zu reagieren. Mit zunehmendem Zellalter scheint dieser Prozess jedoch nicht mehr uneingeschränkt möglich zu sein, was eine Ursache für die zunehmende Vulnerabilität des ZNS gegenüber chronisch degenerativen Erkrankungen im Alter sein kann (Lee *et al.* 2013; Labandeira-Garcia *et al.* 2017).

Der von Ferger *et al.* beschriebene *shift* von Mikrogliazellen hin zu einem anti-inflammatorischen M2-*like* Stadium mit konsekutivem Anstieg der IGF-1 Expression durch IL-4 ließ sich in dieser Arbeit nicht nachvollziehen (Ferber *et al.* 2010). Vielmehr zeigte sich ein zu den Ergebnissen von Suh *et al.* (2013) homologes Verhalten, bei dem eine Stimulation von menschlichen Mikrogliazellen mit LPS zu einer Reduktion der IGF-1 Expression führte (Suh *et al.* 2013).

Es ist demnach denkbar, dass ähnlich dem Verhalten von Fc $\gamma$ R2b eine Veränderung des Aktivitätszustandes der Zellen, induziert durch ein pro-inflammatorisches Stimulans, über die Zeit zu einer Veränderung des Aktivitätszustandes der Mikrogliazellen führt. Gleichzeitig ist auch denkbar, dass die Vereinigung von primären Ratten Mikrogliazellen verschiedenen Alters zu einer Verschiebung der IGF-1 Expression führt. Macht man sich diesen Zustand bewusst, so sind MRC1 und IGF-1 als Marker für einen *shift* des Aktivitätszustandes einzusetzen, da sie in

Relation zur Basal-Expression nach IL-4 oder IL-13 (Ko-) Stimulation eine LPS induzierte Verminderung ihrer Expression erfahren.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die hier beschriebenen Markermoleküle Chi3L1 und MRC1 zur eindeutigen Identifikation des M2a-like Aktivitätszustandes von primären Ratten Mikrogliazellen in Zellkultur verwendet werden können. Erweitert werden kann diese Identifikation und Charakterisierung durch die Verwendung der Markermoleküle FcγR2b sowie IGF-1. Betrachtet werden sollten diesbezüglich jedoch nicht ausschließlich die absoluten Expressionsniveaus nach Stimulation mit anti-inflammatorischen Substanzen wie z.B. IL-4 oder IL-13. Vielmehr sollte eine Reduktion des Expressionsniveaus nach Stimulation mit einer pro-inflammatorischen Substanz wie z.B. LPS als zusätzlicher Hinweis für eine Veränderung des Aktivitätsmusters angesehen werden.

Weiterhin sollte bedacht werden, dass die beschriebenen Unterschiede der Basal-Expressionsniveaus der Markermoleküle nach Stimulation mit IL-4 bzw. LPS eine Auswirkung auf die Aussagekraft der Experimente gehabt haben könnten. Es wurde bei der Auswertung der Daten zwar darauf geachtet, dass nur Ct-Werte mit demselben *threshold cut-off value* (Th 0,03) verwendet wurden, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten; darüber hinaus wurde auch darauf geachtet, dass die Konzentrationen des zur Stimulation der Zellen verwendeten IL-4 bzw. des LPS so abgestimmt waren, dass ähnlich hohe Expressionsniveaus der Markermoleküle erreicht werden konnten; der erwünschte Effekt blieb jedoch aus. Demnach bleibt abzuwägen, ob die beschriebenen Veränderungen in der Basisexpression der Markermoleküle allein von der (unphysiologisch hohen) Dosis und von der Potenz der verwendeten Agenzien abhängen oder ob sie ein realistisches Abbild eines adäquaten Zellreizes darstellen. Weitere Untersuchung zur genaueren Charakterisierung des benötigten Stimulationsreizes für eine alternative Aktivierung von Mikrogliazellen erscheinen nötig, um diese Frage zu klären.

Dennoch stellt die Betrachtung des relativen Expressionsniveaus eines Sets von Markermolekülen nach differenzieller Stimulation mit z.B. LPS vs. IL-4 eine erstrebenswerte Methodik dar, um Rückschlüsse auf den Aktivitätszustand einer Mikrogliazelle zu zulassen. Unter Einbeziehung der Stimulationszeit kann auf diese Art und Weise die Reaktion von Mikrogliazellen auf eine Veränderung der Umgebung während eines inflammatorischen

Prozesses abgebildet und ggf. ein *shift* der Aktivität abgebildet werden. Weitergehende Untersuchungen erscheinen notwendig, um diesen Zusammenhang klarer darzustellen.

## 5.5 *shift* der Aktivität

Um die Möglichkeit zur Abbildung eines möglichen Aktivitätsshiftes weiter zu untersuchen, erfolgte die Ko-Stimulation der Mikrogliazellen mit dem bekannten Aktivator der alternativen Aktivität TFF3 (Arnold *et al.* 2016).

Dabei fiel auf, dass sich bei der 12 - stündigen Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit IL-4 + IL-13 und TFF3 eine Steigerung der Expression von FcγR2b und MRC1, um den Faktor 15 erreichen ließe. Im gleichen Zeitraum kam es nach der Ko-Stimulation mit LPS+TFF3 zu einem deutlichen Rückgang der Expression von FcγR2b. Nach 24 Stunden Ko-Stimulation mit LPS und TFF3 kam es zudem zu einer Reduktion der IGF-1 mRNA Expression.

Dies bestätigt die Annahme, dass die Ko-Stimulation von primären Ratten Mikrogliazellen mit TFF3 zu einer Veränderung hin zu einem anti-inflammatorischen Aktivitätsstadium führt. So lässt sich wie zuvor beschrieben ableiten, dass die Intensivierung der FcγR2b und MRC1 Expression den Wechsel hin zu einer antiinflammatorischen M2-*like* Aktivitätsform der Mikroglia markiert.

Darüber hinaus kann die graduelle, zeitabhängige Reduktion der Expressionsstärke der mRNA von FcγR2b, MRC1 und IGF-1 nach der Stimulation mit LPS + TFF3 für einen Aktivitätsshift hin zu einer alternativen Aktivität sprechen. Zur genaueren Klärung dieser Veränderung hin zu einer alternativen Aktivierung bedarf es weiterer Untersuchungen, z.B. durch die Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit vermeintlich anti-inflammatorisch wirksamen Substanzen und TFF3 sowie die darauffolgende Charakterisierung der Zellen mit den in dieser Arbeit beschriebenen Markern.

## 5.6 Schlussfolgerung

Die Schwierigkeit des eindeutigen Nachweises einer signifikant gesteigerten Aktivität eines einzelnen bekannten Markermoleküls verdeutlicht die Problematik bei der Abbildung eines komplexen Vorgangs wie der differentiellen Aktivierung von primären Ratten Mikrogliazellen durch nur einen einzelnen Marker. Dem gegenüber erscheint die Charakterisierung der alternativen Aktivität durch ein differenziertes Set von relevanten Markermolekülen einen weitaus größeren Bezug zur Realität zu besitzen und zur Beschreibung der Aktivitätszustände von Mikrogliazellen besser geeignet zu sein. Dem schließt sich eine differenziertere Abbildung von Veränderungen des Aktivitätszustandes von Zellen an. In der Zusammenschau ließen sich in dieser Arbeit vier Markermoleküle benennen (Chi3L1, FcγR2b, MRC1 und IGF-1), die sich zur eindeutigen Identifikation der alternativen Aktivität von primären Ratten Mikrogliazellen verwenden ließen. Weiterführend ist die Ergänzung des Sets mit CD163 zur Abgrenzung des M2a-like vom M2c-like Aktivitätszustand empfehlenswert.

Die alleinige Betrachtung des absoluten (positiven) Expressionsniveaus erscheint darüber hinaus nicht adäquat, um eine eindeutige Aussage über den Aktivitätszustand einer Zellpopulation zu treffen. Vielmehr gilt es, die relativen (positiven und negativen) Expressionsniveaus der entsprechenden mRNA zu beurteilen, um eine Aussage über den Status der Zellaktivität treffen zu können. So kann der Verlust einer mRNA Expression eines Markermoleküls nach Stimulation ebenso mit einer Veränderung des Aktivitätszustandes verbunden sein, wie die Überexpression eines anderen Markermoleküls. Demnach lassen sich erst durch die gemeinsame Betrachtung der Expressionsniveaus verschiedener Marker eines Sets Aussagen über den Aktivitätszustand einer Zellpopulation treffen.

Des Weiteren ist zu beachten, dass die Aktivitätszustände von Mikrogliazellen nicht allein von den gewählten Stimulanzen abhängen. Vielmehr ist denkbar, dass die auf den Reiz der Stimulationssubstanz hin hoch- bzw. herunterregulierte Genexpressionen und die ggf. sezernierten Genprodukte ihrerseits zu einer Veränderung der Zellaktivität beitragen können und auf diese Weise die Expressionsprofile der Zellen mit beeinflussen. Eine kritische Betrachtung der Ergebnisse vor dem Hintergrund des zeitlichen Geschehens ist demnach zu empfehlen (Siddiqui *et al.* 2016).

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten Markermoleküle und deren Potential als Indikatoren für die Zuordnung einer Zellpopulation zu einem Subtyp der alternativen Aktivität zu fungieren, sind weitere Experimente empfehlenswert.



## 6 Zusammenfassung

Mikroglia sind eine Population von residenten Glia-Zellen des zentralen Nervensystems. Sie machen zwischen fünf und 20 % der Gliazellmasse aus. Als Abkömmlinge der myeloischen Zelllinie besitzen sie die Fähigkeit sich ähnlich wie ihre Verwandten, die Makrophagen in der Peripherie, im Gehirn zu bewegen. Durch die Annahme verschiedener Aktivitätsformen können sie auf diese Weise die unterschiedlichen Rollen des Immunsystems im zentralen Nervensystem übernehmen. So kommen ihnen Aufgaben in der embryonalen Entwicklung, bei der Abwehr von pathogenen Keimen, bei der Modulation von physiologischen und pathologischen Prozessen sowie bei der Regeneration von Defekten zu. Durch diese Eigenschaften tragen Mikroglia zur Homöostase im zentralen Nervensystem bei.

Was die Mikroglia dazu befähigt, diese verschiedenen Aufgaben zu übernehmen, ist bislang nicht abschließend geklärt. Eine Theorie geht in Anlehnung an die Physiologie der entfernt verwandten Gewebs-Makrophagen davon aus, dass Mikroglia ihr Expressionsmuster im Verlauf der Aktivitätsänderung wechseln. So sollen die Zellen ihr Expressions-Repertoire von einem pro-inflammatorischen *M1-like* Typ hin zu einem anti-inflammatorischen *M2-like* Typ wechseln können. Welche Expressionsmarker für einen solchen Wechsel charakteristisch sind, ist bis heute Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion.

Mit dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Markermoleküle den Wechsel der Aktivitätsform von einem *M1-like* Typ zu einem *M2a-like* Typ in primären Ratten Mikroglia am ehesten charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden in einem unvoreingenommenen qPCR-Assay 42 potenzielle Markermoleküle auf ihre Tauglichkeit zum Nachweis eines Phänotyp Wechsels der Mikroglia getestet. Die Stimulation der Zellen sollte dabei durch LPS zum *M1-like* Typ und durch IL-4 bzw. IL-13 zum *M2a-like* Typ führen. Nach der Auswahl eines geeigneten Sets von vier Markermolekülen wurden mit diesen die biologischen Replikate durchgeführt. Zum Nachweis der Tauglichkeit der Markermoleküle wurden diese am Ende in einem Versuch mit der beschriebenen anti-inflammatorischen Stimulanz TFF3 getestet. Hierbei konnte keine Verschiebung der gesteigerten Expression von *M1-like* Typ Markern hin zu *M2a-like* Typ Markern dargestellt werden. Vielmehr zeigte sich eine Intensivierung der vormaligen Expressionsniveaus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abd-El-Basset, E.; Fedoroff, S.; (1995) 'Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures'. *Journal of Neuroscience Research*, 41(2), pp.222–237.
- Ajami, B.; Bennett, J.L.; Krieger, C.; Tetzlaff, W.; Rossi, F.M. V; (2007) 'Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life'. *Nature Neuroscience*, 10(12), pp.1538–1543.
- Akiyama, H.; McGeer, P.L.; (1990) 'Brain microglia constitutively express  $\beta$ -2 integrins'. *Journal of Neuroimmunology*, 30(1), pp.81–93.
- Alliot, F.; Godin, I.; Pessac, B.; (1999) 'Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain'. *Brain research. Developmental brain research*, 117(2), pp.145–52.
- Amici, S.A.; Dong, J.; Guerau-de-Arellano, M.; (2017) 'Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia'. *Frontiers in Immunology*, 8(11), pp.1–18.
- Arnold, P.; Rickert, U.; Helmers, A.-K.; Spreu, J.; Schneppenheim, J.; Lucius, R.; (2016) 'Trefoil factor 3 shows anti-inflammatory effects on activated microglia'. *Cell and Tissue Research*, 365(1), pp.3–11.
- Barón, M.; Gallego, A.; (1972) 'The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex'. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 128(1), pp.42–57.
- Beers, D. R.; Henkel, J.S.; Xiao, Q.; Zhao, W.; Wang, J.; Yen, A.A.; Siklos, L.; McKercher, S.R.; Appel, S.H.; (2006) 'Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), pp.16021–16026.
- Bertrand, J.Y.; Jalil, A.; Klaine, M.; Jung, S.; Cumano, A.; Godin, I.; (2005) 'Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac'. *Blood*, 106(9), pp.3004–3011.
- Boche, D.; Perry, V.H.; Nicoll, J.A.R.; (2013) 'Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain'. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), pp.3–18.
- Boya, J.; Calvo, J.; Prado, A.; (1979) 'The origin of microglial cells'. *Journal of anatomy*, 129(Pt 1), pp.177–86.

- Butovsky, O.; Jedrychowski, M.P.; Moore, C.S.; Cialic, R.; Lanser, A.J.; Gabriely, G.; Koeglsperger, T.; Dake, B.; Wu, P.M.; Doykan, C.E.; Fanek, Z.; Liu, L.; Chen, Z.; Rothstein, J.D.; Ransohoff, R.M.; Gygi, S.P.; Antel, J.P.; Weiner, H.L.; (2014) 'Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia'. *Nature Neuroscience*, 17(1), pp.131–143.
- Chauhan, P.; Hu, S.; Sheng, W.S.; Prasad, S.; Lokensgard, J.R.; (2017) 'Modulation of Microglial Cell Fc $\gamma$  Receptor Expression Following Viral Brain Infection'. *Scientific reports*, 7, p.41889.
- Cherry, J.D.; Olschowka, J. a; O Banion, M.K.; (2014) 'Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed'. *Journal of neuroinflammation*, 11(1), p.98.
- Chhor, V.; Charpentier, T. Le; Lebon, S.; Oré, M.V.; Celador, I.L.; Josserand, J.; Degos, V.; Jacotot, E.; Hagberg, H.; Sävman, K.; Mallard, C.; Gressens, P.; Fleiss, B.; (2013) 'Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro'. *Brain, behavior, and immunity*, 32, 70–85.
- Chomczynski, P.; (1987) 'Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction'. *Analytical biochemistry*, 162(1):156-9
- Chomczynski, P.; Sacchi, N.; (2006) 'The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on'. *Nature protocols*, 1(2), pp.581–5.
- Colton, C.; (2009) 'Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain'. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 4(4), pp.399–418.
- Colton, C.; Mott, R.T.; Sharpe, H.; Xu, Q.; Van Nostrand, W.E.; Vitek, M.P.; (2006) 'Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD'. *Journal of neuroinflammation*, 3, p.27.
- Cuadros, M.A.; Navascués, J.; (1998) 'The origin and differentiation of microglial cells during development'. *Progress in neurobiology*, 56(2), pp.173–89.
- Daneman, R.; (2012) 'The blood-brain barrier in health and disease'. *Annals of Neurology*, 72(5), pp.648–672.
- Davalos, D.; Grutzendler, J.; Yang, G.; Kim, J. V; Zuo, Y.; Jung, S.; Littman, D.R.; Dustin, M.L.; Gan, W.-B.; (2005) 'ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo'. *Nature Neuroscience*, 8(6), pp.752–758.
- Deng, Y.Y.; Lu, J.; Ling, E.-A.; Kaur, C.; (2010) 'Microglia-Derived Macrophage Colony Stimulating Factor Promotes Generation of Proinflammatory Cytokines by Astrocytes in the Periventricular White Matter in the Hypoxic Neonatal Brain'. *Brain Pathology*, 20(5), pp.909–25.

- Fedoroff, S.; Hertz, L.; (1981) 'Advances in cellular neurobiology', Academic Press, Volume 2
- Ferger, A.I.; Campanelli, L.; Reimer, V.; Muth, K.N.; Merdian, I.; Ludolph, A.C.; Witting, A.; (2010) 'Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia'. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), p.45.
- Ferreira, R.; Lively, S.; Schlichter, L.C.; (2014) 'IL-4 type 1 receptor signaling up-regulates KCNN4 expression, and increases the KCa3.1 current and its contribution to migration of alternative-activated microglia'. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, p.183.
- Thermo Fisher Scientific; (2010) '7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments (online PDF, Pub. No. 4387779, Revision D)'.  
[https://www.thermofisher.com/document中心/thermo\\_fisher/10101770.pdf](https://www.thermofisher.com/document中心/thermo_fisher/10101770.pdf)
- Muskett, F.W.; May, F.E.; Westley, B.R.; Feeney, J.; (2003) 'Solution Structure of the Disulfide-Linked Dimer of Human Intestinal Trefoil Factor (TFF3): The Intermolecular Orientation and Interactions Are Markedly Different from Those of Other Dimeric Trefoil Proteins'. *Biochemistry*, 42(51):15139-47.
- Fukuyama, H.; Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V.; (2005) 'The inhibitory Fcγ receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G+ anti-DNA plasma cells'. *Nature Immunology*, 6(1), pp.99–106.
- Gadani, S.P.; Cronk, J.C.; Norris, G.T.; Kipnis, J.; (2012) 'IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember'. *The Journal of Immunology*, 189(9), pp.4213–4219.
- Gazi, U.; Martinez-Pomares, L.; (2009) 'Influence of the mannose receptor in host immune responses'. *Immunobiology*, 214(7), pp.554–561.
- Ginhoux, F.; Greter, M.; Leboeuf, M.; Nandi, S.; See, P.; Gokhan, S.; Mehler, M.F.; Conway, S.J.; Ng, L.G.; Stanley, E.R.; Samokhvalov, I.M.; Merad, M.; (2010) 'Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages'. *Science*, 330(6005), pp.841–845.
- Ginhoux, F.; Lim, S.; Hoeffel, G.; Low, D.; Huber, T.; (2013) 'Origin and differentiation of microglia'. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 45.
- Godin, I.E.; Garcia-Porrero, J.A.; Coutinho, A.; Dieterlen-Lièvre, F.; Marcos, M.A.R.; (1993) 'Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors'. *Nature*, 364(6432), pp.67–70.
- Gordon, S.; (2003) 'Alternative activation of macrophages'. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), pp.23–35.
- Graeber, M.B.; (2010) 'Changing face of microglia'. *Science*, 330(6005), pp.783–788.
- Graeber, M.B.; Li, W.; Rodriguez, M.L.; (2011) 'Role of microglia in CNS inflammation'. *FEBS letters*, 585(23), pp.3798–805.

- Guppy, N.J.; El-Bahrawy, M.E.; Kocher, H.M.; Fritsch, K.; Qureshi, Y.A.; Poulsom, R.; Jeffery, R.E.; Wright, N.A.; Otto, W.R.; Alison, M.R.; (2012) 'Trefol factor family peptides in normal and diseased human pancreas'. *Pancreas*, 41(6), pp.888–96.
- Hanisch, U.-K.; Kettenmann, H.; (2007) 'Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain'. *Nature Neuroscience*, 10(11), pp.1387–1394.
- Herbomel, P.; Thisse, B.; Thisse, C.; (2001) 'Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process'. *Developmental Biology*, 238(2), pp.274–288.
- Heusser, C.H.; Anderson, C.L.; Grey, H.M.; (1977) 'Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line.'. *The Journal of experimental medicine*, 145(5), pp.1316–27.
- Hinz, M.; Schwegler, H.; Chwieralski, C.E.; Laube, G.; Linke, R.; Pohle, W.; Hoffmann, W.; (2004) 'Trefol factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum'. *Peptides*, 25(5), pp.827–832.
- Hoffmann, W.; Jagla, W.; Wiede, A.; (2001) 'Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain.'. *Histology and histopathology*, 16(1), pp.319–34.
- Holzapfel, B.; Wickert, L.; (2007) 'Die quantitative real-time-pcr (qrt-pcr). Methoden und anwendungsgebiete'. *Biologie in Unserer Zeit*, 37(2), pp.120–126.
- Hughes, V.; (2012) 'The Constant gardeners'. *Nature*, vol. 485, pp. 570-572
- Hung, S.-I.; Chang, A.C.; Kato, I.; Chang, N.-C.A.; (2002) 'Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation'. *Journal of leukocyte biology*, 72(1), pp.72–82.
- Itoh, H.; Tomita, M.; Uchino, H.; Kobayashi, T.; Kataoka, H.; Sekiya, R.; Nawa, Y.; (1996) 'cDNA cloning of rat pS2 peptide and expression of trefol peptides in acetic acid-induced colitis'. *The Biochemical journal*, 318 ( Pt 3)(Pt 3), pp.939–44.
- Jagla, W.; Wiede, A.; Dietzmann, K.; Rutkowski, K.; Hoffmann, W.; (2000) 'Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus'. *FASEB journal*, 14(9), pp.1126–31.
- Kádár, A.; Wittmann, G.; Liposits, Z.; Fekete, C.; (2009) 'Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining'. *Journal of neuroscience methods*, 184(1), pp.115–8.
- Katsumoto, A.; Lu, H.; Miranda, A.S.; Ransohoff, R.M.; (2014) 'Ontogeny and functions of central nervous system macrophages'. *Journal of immunology*, 193(6), pp.2615–21.

- Kettenmann, H.; Hanisch, U.-K.; Noda, M.; Verkhratsky, A.; (2011) 'Physiology of Microglia'. *Physiological Reviews*, 91(2), pp.461–553.
- Kierdorf, K.; Prinz, M.; (2013) 'Factors regulating microglia activation'. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(44), pp.1–8.
- Kigerl, K.A.; Gensel, J.C.; Ankeny, D.P.; Alexander, J.K.; Donnelly, D.J.; Popovich, P.G.; (2009) 'Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord'. *Journal of Neuroscience*, 29(43), pp.13435–13444.
- Kigerl, K.A.; Gensel, J.C.; Ankeny, D.P.; Alexander, J.K.; Donnelly, D.J.; Popovich, P.G.; (2010) 'Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord'. *J Neurosci.*, 29(43), pp.13435–13444.
- Kitamura, T.; Miyake, T.; Fujita, S.; (1984) 'Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus'. *The Journal of comparative neurology*, 226(3), pp.421–33.
- De Kleer, I.; Willems, F.; Lambrecht, B.; Goriely, S.; (2014) 'Ontogeny of myeloid cells'. *Frontiers in immunology*, 5, p.423.
- Kumaravelu, P.; Hook, L.; Morrison, A.M.; Ure, J.; Zhao, S.; Zuyev, S.; Ansell, J.; Medvinsky, A.; (2002) 'Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver'. *Development*, 129(21), pp.4891–9.
- Labandeira-Garcia, J.L.; Costa-Besada, M.A.; Labandeira, C.M.; Villar-Cheda, B.; Rodríguez-Perez, A.I.; (2017) 'Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation'. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, p.365.
- Ladeby, R.; Wirenfeldt, M.; Garcia-Ovejero, D.; Fenger, C.; Dissing-Olesen, L.; Dalmau, I.; Finsen, B.; (2005) 'Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system'. *Brain Research Reviews*, 48(2), pp.196–206.
- Lassmann, H.; Hickey, W.F.; (1993) 'Radiation bone marrow chimeras as a tool to study microglia turnover in normal brain and inflammation'. *Clinical neuropathology*, 12(5), pp.284–5.
- Lee, D.C.; Ruiz, C.R.; Lebson, L.; Selenica, M.-L.B.; Rizer, J.; Hunt, J.B.; Rojiani, R.; Reid, P.; Kammath, S.; Nash, K.; Dickey, C.A.; Gordon, M.; Morgan, D.; (2013) 'Aging enhances classical activation but mitigates alternative activation in the central nervous system'. *Neurobiology of Aging*, 34(6), pp.1610–1620.

- Li, F.; Smith, P.; Ravetch, J. V.; (2014) 'Inhibitory Fcγ receptor is required for the maintenance of tolerance through distinct mechanisms'. *Journal of immunology*, 192(7), 3021–3028.
- Ling, H.; Recklies, A.D.; (2004) 'The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-α'. *The Biochemical journal*, 380(Pt 3), pp.651–9.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D.; (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method'. *Methods*, 25(4), pp.402–408.
- Lively, S.; Schlichter, L.C.; (2018) 'Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFNγ+TNFα) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10)'. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, p.215.
- Loane, D. J.; Kumar, A.; (2015). 'Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated'. *Experimental neurology*, 275 Pt 3(0 3), 316–327.
- Lynch, M.A.; (2009) 'The Multifaceted Profile of Activated Microglia'. *Molecular Neurobiology*, 40(2), pp.139–156.
- Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M.; (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization'. *Trends in Immunology*, 25(12), pp.677–686.
- Martinez, F.O.; Sica, A.; Mantovani, A.; Locati, M.; (2008) 'Macrophage activation and polarization'. *Frontiers in bioscience*, 13, pp.453–61.
- Matsumoto, Y.; Fujiwara, M.; (1987) 'Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen-bearing microglia in the rat central nervous system of radiation bone marrow chimeras'. *Journal of neuroimmunology*, 17(1), pp.71–82.
- McCarthy, K. D.; de Vellis, J.; (1980) 'Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue'. *The Journal of cell biology*, 85(3), 890–902.
- McGrath, K.E.; Koniski, A.D.; Malik, J.; Palis, J.; (2003) 'Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo'. *Blood*, 101(5), pp.1669–1675.
- McKercher, S.R.; Torbett, B.E.; Anderson, K.L.; Henkel, G.W.; Vestal, D.J.; Baribault, H.; Klemsz, M.; Feeney, a J.; Wu, G.E.; Paige, C.J.; Maki, R. a; (1996) 'Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities'. *The EMBO journal*, 15(20), pp.5647–5658.
- Medvinsky, A.L.; Samoylina, N.L.; Müller, A.M.; Dzierzak, E.A.; (1993) 'An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse'. *Nature*, 364(6432), pp.64–67.
- Mildner, A.; Schmidt, H.; Nitsche, M.; Merkler, D.; Hanisch, U.-K.; Mack, M.; Heikenwalder, M.; Brück, W.; Priller, J.; Prinz, M.; (2007) 'Microglia in the adult brain arise from Ly-

- 6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions'. *Nature Neuroscience*, 10(12), pp.1544–1553.
- Mizutani, M.; Pino, P.A.; Saederup, N.; Charo, I.F.; Ransohoff, R.M.; Cardona, A.E.; (2012) 'The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood'. *The Journal of Immunology*, 188(1), pp.29–36.
- Mori, S.; Leblond, C.P.; (1969) 'Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat'. *The Journal of Comparative Neurology*, 137(2), pp.197–225.
- Morley, B.; (1995) 'PCR — The polymerase chain reaction by K.B. Mullis, F. Ferré and R.A. Gibbs Birkhauser Verlag AG, 1994. SwFr84 pbk (458 pages) ISBN 0 8176 3750 8'. *Trends in Genetics*, 11(6), p.249.
- Mosser, D.M.; Edwards, J.P.; (2008) 'Exploring the full spectrum of macrophage activation'. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp.958–969.
- Naito, M.; Takahashi, K.; Nishikawa, S.; (1990) 'Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver'. *Journal of leukocyte biology*, 48(1), pp.27–37.
- Nimmerjahn, A.; Kirchhoff, F.; Helmchen, F.; (2005) 'Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo'. *Science*, 308(5726):1314-8
- Nimmerjahn, F.; (2016) 'Translating Inhibitory Fc Receptor Biology into Novel Therapeutic Approaches'. *Journal of Clinical Immunology*, 36(S1), pp.83–87.
- Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V.; (2008) 'Fcγ receptors as regulators of immune responses'. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), pp.34–47.
- Nissl, F.; (1913) 'Histologische und histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde : mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie der Geisteskrankheiten'. *Fischer*.
- Norden, D.M.; Fenn, A.M.; Dugan, A.; Godbout, J.P.; (2014) 'TGFβ produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation'. *Glia*, 62(6), pp.881–895.
- Novak, M.L.; Koh, T.J.; (2013) 'Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair'. *The American Journal of Pathology*, 183(5), pp.1352–1363.
- O'Donnell, S.L.; Frederick, T.J.; Krady, J.K.; Vannucci, S.J.; Wood, T.L.; (2002) 'IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain'. *Glia*, 39(1), pp.85–97.
- Orkin, S.H.; Zon, L.I.; (2008) 'Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology'. *Cell*, 132(4), pp.631–644.



- Perry, V.H.; Hume, D.A.; Gordon, S.; (1985) 'Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain'. *Neuroscience*, 15(2), pp.313–326.
- Perry, V.H.; (1998) 'A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation'. *Journal of Neuroimmunology*, 90(2), pp.113–121.
- Pricop, L.; Redecha, P.; Teillaud, J.L.; Frey, J.; Fridman, W.H.; Sautès-Fridman, C.; Salmon, J.E.; (2001) 'Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines'. *Journal of immunology*, 166(1), pp.531–7.
- Priller, J.; Flügel, A.; Wehner, T.; Boentert, M.; Haas, C.A.; Prinz, M.; Fernández-Klett, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; de Boer, B.A.; Frotscher, M.; Kreutzberg, G.W.; Persons, D.A.; Dirnagl, U.; (2001) 'Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment'. *Nature Medicine*, 7(12), pp.1356–1361.
- Prinz, M.; Priller, J.; (2014) 'Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease'. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), pp.300–312.
- Probst, J.C.; Zetzsche, T.; Weber, M.; Theilemann, P.; Skutella, T.; Landgraf, R.; Jirikowski, G.F.; (1996) 'Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide'. *FASEB journal*, 10(13), pp.1518–23.
- Raes, G.; De Baetselier, P.; Noël, W.; Beschin, A.; Brombacher, F.; Hassanzadeh Gh, G.; (2002) 'Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages'. *Journal of leukocyte biology*, 71(4), pp.597–602.
- Raes, G.; Van den Bergh, R.; De Baetselier, P.; Ghassabeh, G.H.; Scotton, C.; Locati, M.; Mantovani, A.; Sozzani, S.; (2005) 'Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells'. *Journal of immunology*, 174(11), pp.6561; author reply 6561-2.
- Ransohoff, R.M.; Brown, M. a; (2012) 'Review series Innate immunity in the central nervous system'. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), pp.1164–1171.
- Ransohoff, R.M.; Cardona, A.E.; (2010) 'The myeloid cells of the central nervous system parenchyma'. *Nature*, 468(7321), pp.253–62.
- Recklies, A.D.; White, C.; Ling, H.; (2002) 'The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways'. *The Biochemical journal*, 365(Pt 1), pp.119–26.

- Rehli, M.; Krause, S.W.; Andreesen, R.; (1997) 'Molecular Characterization of the Gene for Human Cartilage gp-39 (CHI3L1), a Member of the Chitinase Protein Family and Marker for Late Stages of Macrophage Differentiation'. *Genomics*, 43(2), pp.221–225.
- del Rio-Hortega, P.; (1932) 'Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System'. *Canadian Medical Association Journal*, 27(5), p.576.
- Rösler, S.; Haase, T.; Claassen, H.; Schulze, U.; Schicht, M.; Riemann, D.; Brandt, J.; Wohlrab, D.; Müller-Hilke, B.; Goldring, M.B.; Sel, S.; Varoga, D.; Garreis, F.; Paulsen, F.P.; (2010) 'Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes.'. *Arthritis and rheumatism*, 62(3), pp.815–25.
- Salter, M.W.; Beggs, S.; (2014) 'Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS.'. *Cell*, 158(1), pp.15–24.
- dos Santos Silva, E.; Ulrich, M.; Döring, G.; Botzenhart, K.; Gött, P.; (2000) 'Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract'. *The Journal of pathology*, 190(2), pp.133–42.
- Saura, J.; Tusell, J.M.; Serratos, J.; (2003) 'High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization'. *Glia*, 44(3), pp.183–9.
- Schulz, C.; Perdiguero, E.G.; Chorro, L.; Szabo-Rogers, H.; Cagnard, N.; Kierdorf, K.; Prinz, M.; Wu, B.; Jacobsen, S.E.W.; Pollard, J.W.; Frampton, J.; Liu, K.J.; Geissmann, F.; (2012) 'A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells'. *Science*, 336(6077), pp.86–90.
- Schwarz, H.; Jagla, W.; Wiede, A.; Hoffmann, W.; (2001) 'Ultrastructural co-localization of TFF3-peptide and oxytocin in the neural lobe of the porcine pituitary'. *Cell and tissue research*, 305(3), pp.411–6.
- Sica, A.; Mantovani, A.; (2012) 'Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas'. *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), pp.787–795.
- Siddiqui, T.A.; Lively, S.; Schlichter, L.C.; (2016) 'Complex molecular and functional outcomes of single versus sequential cytokine stimulation of rat microglia'. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), p.66.
- Stein, M.; Keshav, S.; Harris, N.; Gordon, S.; (1992) 'Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation'. *The Journal of experimental medicine*, 176(1), pp.287–92.
- Stence, N.; Waite, M.; Dailey, M.E.; (2001) 'Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices'. *Glia*, 33(3), pp.256–266.

- Streit, W.J.; Walter, S.A.; Pennell, N.A.; (1999) 'Reactive microgliosis.'. *Progress in neurobiology*, 57(6), pp.563–81.
- Suh, H.-S.; Zhao, M.-L.; Derico, L.; Choi, N.; Lee, S.C.; (2013) 'Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF-1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators'. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), p.805.
- Takai, T.; Li, M.; Sylvestre, D.; Clynes, R.; Ravetch, J. V.; (1994) 'FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects'. *Cell*, 76(3), pp.519–29.
- Tambuyzer, B.R.; Ponsaerts, P.; Nouwen, E.J.; (2009) 'Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology'. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(3), pp.352–370.
- Tavian, M.; Peault, B.; (2005) 'Embryonic development of the human hematopoietic system'. *The International Journal of Developmental Biology*, 49(2–3), pp.243–250.
- Taylor, P.R.; Martinez-Pomares, L.; Stacey, M.; Lin, H.-H.; Brown, G.D.; Gordon, S.; (2005) 'Macrophage receptors and immune recognition'. *Annual Review of Immunology*, 23(1), pp.901–944.
- Thim, L.; (1997) 'Trefoil peptides: from structure to function'. *Cellular and molecular life sciences*, 53(11–12), pp.888–903.
- Tremblay, M.-È.; Stevens, B.; Sierra, A.; Wake, H.; Bessis, A.; Nimmerjahn, A.; (2011) 'The role of microglia in the healthy brain'. *The Journal of neuroscience*, 31(45), pp.16064–9.
- Ueno, M.; Fujita, Y.; Tanaka, T.; Nakamura, Y.; Kikuta, J.; Ishii, M.; Yamashita, T.; (2013) 'Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development'. *Nature Neuroscience*, 16(5), pp.543–551.
- Vallièrès, L.; Sawchenko, P.E.; (2003) 'Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity'. *The Journal of neuroscience*, 23(12), pp.5197–207.
- Varin, A.; Gordon, S.; (2009) 'Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology'. *Immunobiology*, 214(7), pp.630–641.
- Vincent, V.A.; Tilders, F.J.; Van Dam, A.M.; (1997) 'Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta'. *Glia*, 19(3), pp.190–8.
- Wang, C.C.; Wu, C.H.; Shieh, J.Y.; Wen, C.Y.; Ling, E.A.; (1996) 'Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain'. *Journal of anatomy*, 189 ( Pt 3), pp.567–74.
- Wu, J.; Zhang, J.; Xue, G.; Zhang, H.; (2014) 'Expression and localization of trefoil factor family genes in rat submandibular glands'. *Biotechnic Histochemistry*, 89(6), pp.424–432.

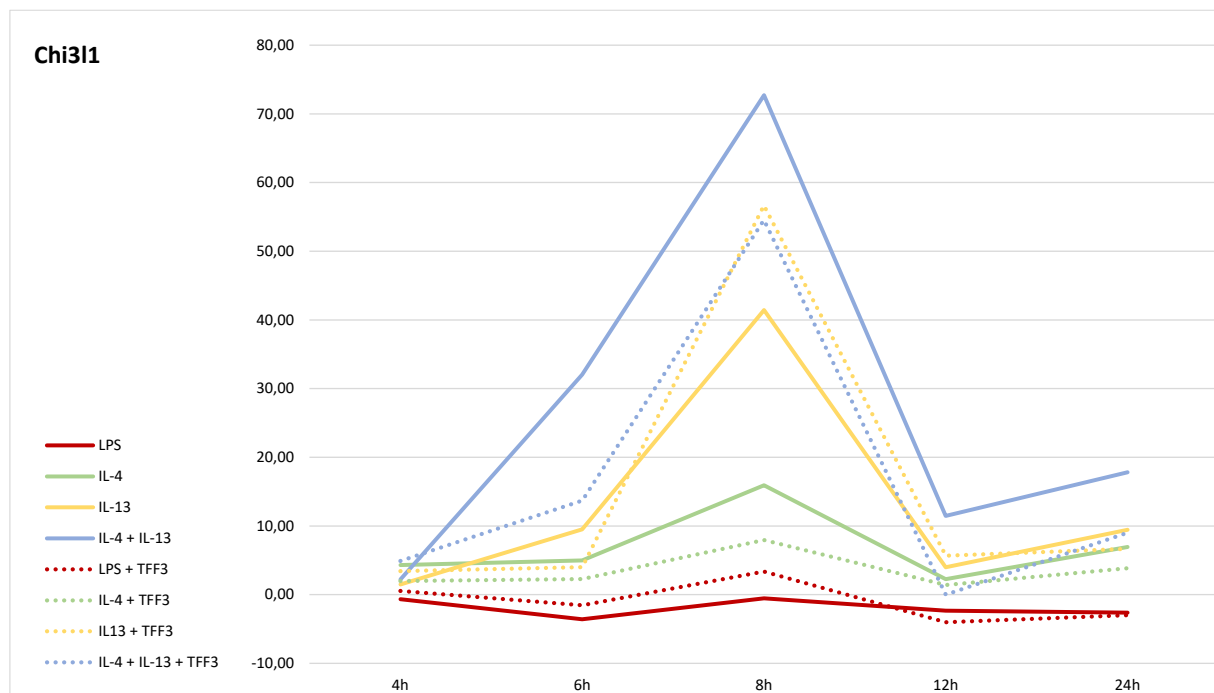
---

Zheng, X.; Wang, Q.; Cao, X.; Yang, Z.; (2015) '[Up-regulated expression of FcγRIIB inhibits phagocytosis and chemotaxis of macrophages]'. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 31(8), pp.1022–6.

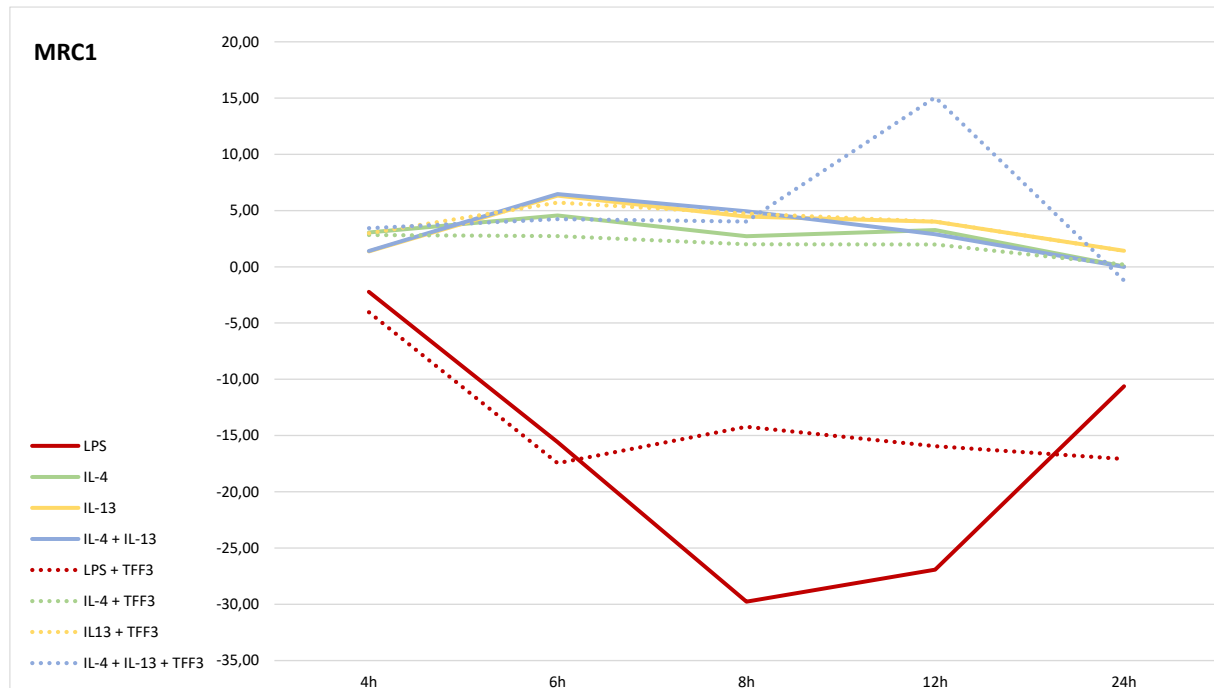
## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ontogenese der Mikroglia	3
Abbildung 1.2: Differenzierung von Mikrogliazellen	7
Abbildung 1.3: Verschiebung der Differenzierung	9
Abbildung 1.4: Differenzielle Aktivierung von Mikroglia	10
Abbildung 1.5: Schema der IL-4 und IL-13 Rezeptoren	13
Abbildung 3.1: RT <sup>2</sup> Custom qPCR Array™ 96-Well Mikrotiterplatten Layout	40
Abbildung 3.2: Solis BioDyne Einzelplatten Layout	46
Abbildung 4.1: LPS induzierte mRNA Expression putativer pro- und anti-inflammatorischer Markergene	51
Abbildung 4.2: IL-4 induzierte mRNA Expression putativer pro- und anti-inflammatorischer Markergene	54
Abbildung 4.3: Chi3L1 Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation	57
Abbildung 4.4: MRC1 Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation	59
Abbildung 4.5: FcγR2b Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation	60
Abbildung 4.6: IGF-1 Expression nach IL-4 + IL-13 Ko-Stimulation	61
Abbildung 4.7: Expression von Chi3L1 nach Ko-Stimulation mit TFF3	62
Abbildung 4.8: Expression von MRC1 nach Ko-Stimulation mit TFF3	64
Abbildung 4.9: Expression von FcγR2b nach Ko-Stimulation mit TFF3	65
Abbildung 4.10: Expression von IGF-1 nach Ko-Stimulation mit TFF3	66
Abbildung 8.1: Chi3L1 Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3	92
Abbildung 8.2: MRC1 Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3	93
Abbildung 8.3: FcγR2b Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3	94
Abbildung 8.4: IGF-1 Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3	95

## 9 Anhang

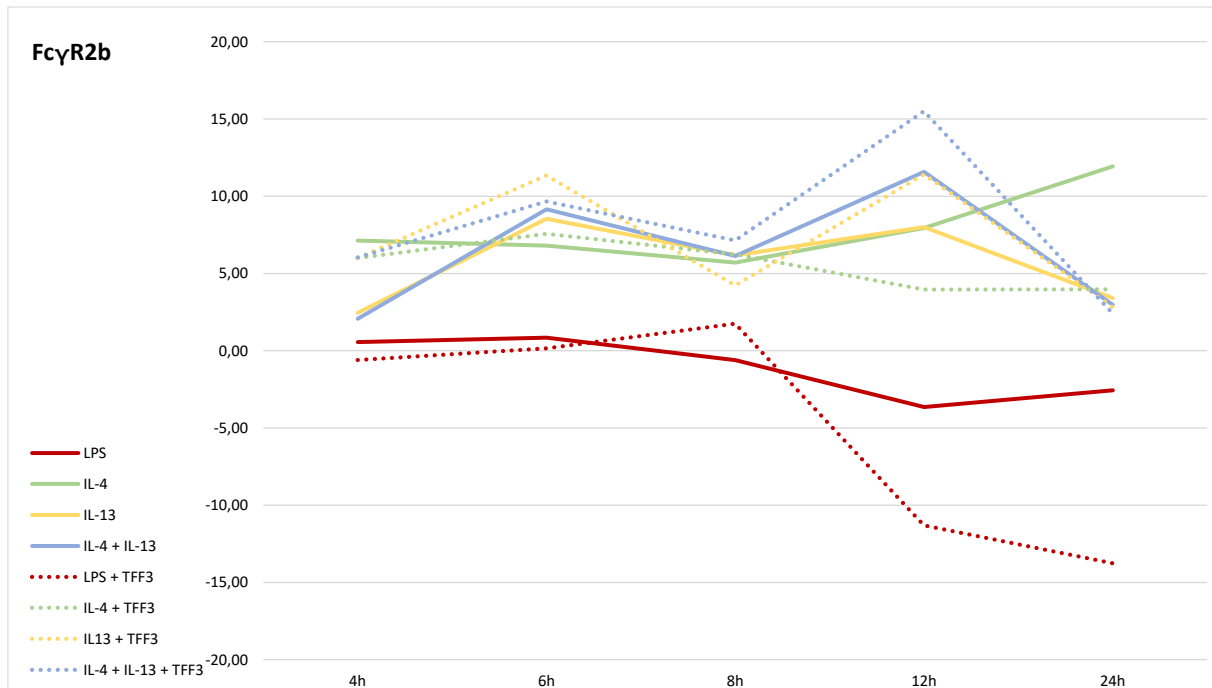


**Abbildung 8.1: Chi3L1 Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich anti-inflammatorischen Markergens Chi3L1 (Chitinase 3 like 1) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression wohingegen die Stimulation mit IL-4 zu einer Zunahme der Expression um den Faktor 6,5 führt. Durch die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 lässt sich die Expression von Chi3L1 auf den Faktor 12,5 bzw. 28 steigern. Nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-13 bzw. IL-4 mit TFF3 lässt sich eine deutlichere Veränderung der Markergenexpression feststellen als nach der Einzelstimulation. (n = 6).



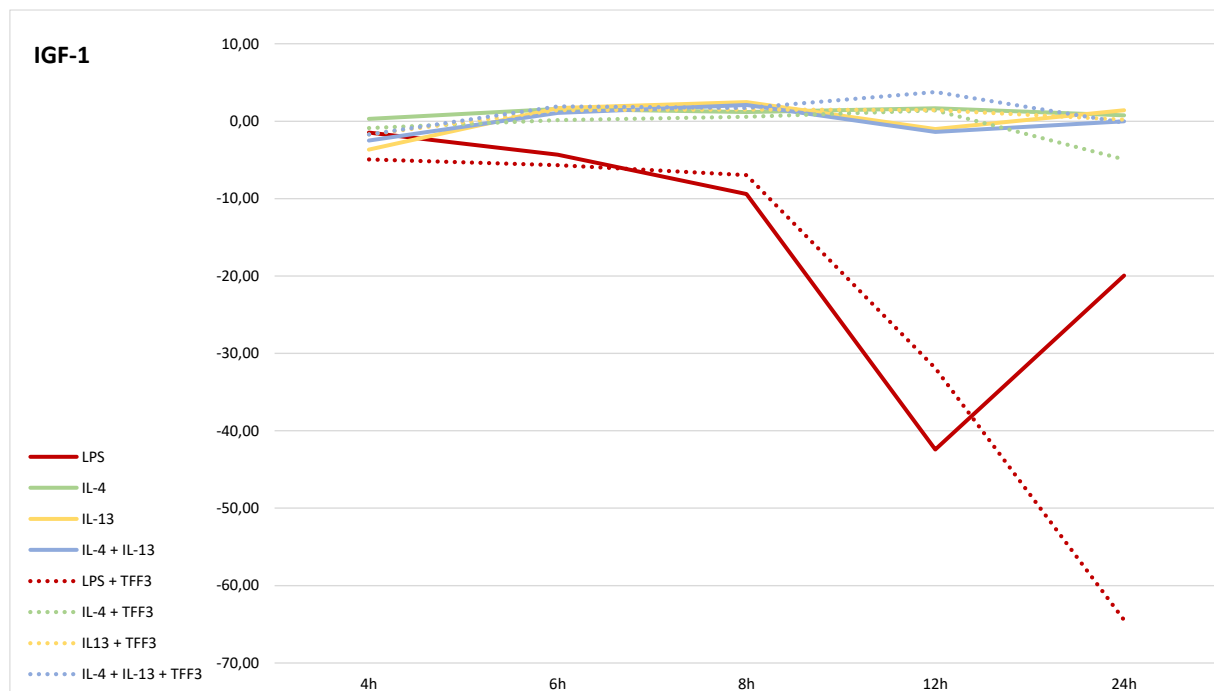
**Abbildung 8.2: MRC1 Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3:**

Dargestellt ist die Expression des vermeintlich anti-inflammatorischen Markergens MRC1 (mannose receptor c-type 1) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Expression wobei der Tiefpunkt nach 8 Stunden erreicht wird. Durch Stimulation mit IL-4 lässt sich eine 3-fache Zunahme der Expression beobachten. Die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 führt zu einem geringfügigen Anstieg der Expression von MRC1, welche im zeitlichen Verlauf jedoch wieder abnimmt. Nach der Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS und TFF3 pendelt sich das Expressionsniveau bei ca. dem – 16-Fachen an. (n = 6).



**Abbildung 8.3: FcγR2b Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich pro-inflammatorischen Markergens FcγR2b (Fc fragment of Igγ receptor IIb) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zur Abnahme der Expression im zeitlichen Verlauf wohingegen die Stimulation mit IL-4 zu einer bis zu 12-fachen Zunahme der Expression führt. Durch die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 lässt sich die Expression von FcγR2b nach 6 und 12 Stunden geringfügig steigern (Faktor 9 bzw. 11,5). Durch die Kombination der Stimulantien LPS und TFF3 zeigt sich nach 12 - bzw. 24 - stündiger Stimulation hingegen eine deutliche Reduktion der FcγR2b Expression (LPS Stimulation: Minimum -3,5-fach bzw. -2,5-fach; LPS + TFF3 Stimulation: Minimum -11-fach bzw. -14-fach). (n = 6).





**Abbildung 8.4: IGF-1 Expression nach LPS, IL-4 + IL-13 Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit TFF3:** Dargestellt ist die Expression des vermeintlich anti-inflammatorischen Markergens IGF-1 (insulin *like* growth factor 1) nach der Stimulation bzw. Ko-Stimulation von Mikrogliazellen mit LPS, IL-4, IL-13 bzw. IL-4 + IL-13 für jeweils 4, 6, 8, 12 oder 24 Stunden. Nach der Stimulation mit LPS kommt es zur zeitabhängigen Abnahme der Expression. Die Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit IL-4 bzw. IL-4 + IL-13 bedingt keine eindeutige Zunahme der Expression. Nach 12 - bzw. 24 - stündiger pro-inflammatorischer Stimulation mit LPS zeigt sich dem gegenüber eine deutliche Reduktion der Expression (ca. – 42-fach bzw. ca. – 11-fach). Durch die Kombination von LPS mit TFF3 lässt sich diese Reduktion, für eine Stimulationszeit von 24 Stunden, weiter auf ein minimales Niveau von dem -64-Fachen verstärken. (n = 6).

## 10 Danksagung

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei meinem akademischen Lehrer Herrn Professor Ralph Lucius für das vertrauensvolle Entgegenkommen mich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu lassen; dankbar bin ich Herrn Professor Lucius darüber hinaus in besonderem Maße dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, am Anatomischen Institut für 4,5 Jahre zu arbeiten und eine für mich und meinen beruflichen Werdegang bedeutsame Zeit zu erleben.

Mein ganz besonderer Dank gilt daneben meinen geachteten und geschätzten Kollegen der AG Lucius am Anatomischen Institut Frau Dr. Uta Rickert, Frau Monika Grell und Frau Gaby Steinkamp, die mich insbesondere im praktischen Teil meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben und mir mit ihrem fachlichen Wissen und persönlichen Rat stets gern zur Seite standen.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts für ihre mich motivierende Unterstützung und ihre engagierte Hilfsbereitschaft; besonders hervorheben möchte ich dabei Herrn Otfried Frandsen für die technische Unterstützung des Projektes Hirnschnitte, Herrn und Frau Gundlach, Frau Winkler und Herrn Benecke für die hervorragende Unterstützung der makroskopischen Lehre und für die Bereitstellung der Präparate und nicht zuletzt Frau Karola Knoke und Frau Elsbeth Daniel für ihre hervorragende Unterstützung in allen Organisationsfragen.

Darüber hinaus möchte ich meinen Kollegen Frau Dr. Katja Schröder, Frau Dr. Christina Lange und Herrn Dr. François Cossais für ihre fortwährende fachliche und menschliche Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank gebührt auch meiner Ehefrau Sarah Brück, die zu jeder Zeit an meiner Seite stand, mich in allen Lebenslagen unterstützte und mir dabei den nötigen Halt gab. Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer gefördert und in allen Entscheidungen auf meinem Bildungs- sowie Lebensweg unterstützt haben. Herzlich danken möchte ich auch meiner Schwester Johanna, auf die ich mich immer verlassen konnte und kann. Ein Dank und ein großer Gruß geht auch an meine Tochter Lorena.